



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Renata Silva Freitas

Toxidade aguda e crônica por amônia do camarão de água-doce *Macrobrachium amazonicum*,
Heller, 1862

Uberaba-MG

2022

Renata Silva Freitas

Toxidade aguda e crônica por amônia do camarão de água-doce *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862

Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pereira Garçon

Uberaba-MG

2022

Catálogo na fonte:
Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

F938t Freitas, Renata Silva
Toxicidade aguda e crônica por amônia do camarão de água-doce *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862/ Renata Silva Freitas. -- 2021.
100 p. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021
Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pereira Garçon

I. Toxicidade. 2. Amônia. 3. Aquicultura. 4. Camarões -- Criação.
I. Garçon, Daniela Pereira. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
III. Título.

CDU 595.371

RENATA SILVA FREITAS

Toxidade aguda e crônica por amônia do camarão de água-doce *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862

Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pereira Garçon

Uberaba, 27 de agosto de 2021

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Daniela Pereira Garçon - Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dra. Roseli Aparecida da Silva Gomes
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Rogério Oliveira Faleiros
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Documento assinado eletronicamente por DANIELA PEREIRA GARCON, Professor do Magistério Superior, em 27/08/2021, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por ROSELI APARECIDA DA SILVA GOMES , Professor do Magistério Superior, em 30/08/2021, às 13:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por ROGÉRIO OLIVEIRA FALEIROS, Usuário Externo, em 30/08/2021, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0581664 e o código CRCDA6AC84C.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar meu caminho e enviar as pessoas certas em cada momento da minha vida.

Aos meus pais Nilce e Valmir, meus filhos João André e José Gabriel e meu esposo Adilson, pelo suporte e amor incondicional.

À minha orientadora Daniela Pereira Garçon, por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de desenvolver um projeto maravilhoso. Muito obrigada pelo carinho, amizade, conversas, risadas e ensinamentos ao longo desses anos.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro e ao *Campus* Universitário de Iturama.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e aos professores do programa, pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento profissional.

À CAPES pelo incentivo científico.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) — Código de Financiamento 001.

RESUMO

A qualidade da água é essencial para o sucesso da atividade aquícola. No caso da carcinicultura de água doce, as concentrações de amônia podem aumentar consideravelmente, mesmo quando a água de cultivo é frequentemente renovada, aumentando o risco de intoxicação por esse composto nitrogenado. O *Macrobrachium amazonicum* tem uma importância relevante na ecologia, na cadeia, sendo amplamente pescado e consumido na região Nordeste, esta espécie vem sendo usada como um biomarcador da qualidade de corpos d'água e como organismo modelo para estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares dentre os quais podemos citar: a avaliação do efeito de diferentes salinidades na sobrevivência e na muda de larvas, o papel dos aminoácidos e a tolerância à salinidade em diferentes estágios ontogenéticos, a caracterização cinética da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase em indivíduos adultos e em diferentes estágios ontogenéticos, a caracterização cinética da atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺, K⁺)-ATPase em diferentes condições de salinidade, a caracterização ultraestrutural das brânquias, o efeito da salinidade do meio na atividade e expressão de (Na⁺, K⁺)-ATPase e V(H⁺)-ATPase, os efeitos da presença de amônia no meio em diferentes transportadores e enzimas do estresse oxidativo, a caracterização cinética da atividade V(H⁺)-ATPase em diferentes estágios ontogenéticos, a regulação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase por amins biogênicas exógenas (Lucena et al., e regulação da fosforilação/desfosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase por amins biogênicas exógenas. Investigamos a letalidade da amônia (LC₅₀-96 h) em uma população hololimnética do camarão *Macrobrachium amazonicum* da Bacia do Rio Paraná / Paraguai e os efeitos de uma concentração de amônia 'segura' na atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase da branquial. A concentração letal média de amônia durante 96 h de exposição para essa população foi estimada em 49,27 mg L⁻¹ de amônia total ou 1,8 mg L⁻¹ de amônia não ionizada. Este valor é superior ao de populações da Bacia do Rio Amazonas e de *M. rosenbergii* e é comparável aos de crustáceos marinhos. O nível 'seguro' foi calculado como 4,9 mg L⁻¹ de amônia total. A exposição de *M. amazonicum* a concentrações seguras de amônia (4,9 mg L⁻¹ de amônia total) por 10 dias aumentou a atividade das enzimas branquiais como (Na⁺, K⁺)-ATPase (1,3 vezes), V (H⁺)-ATPase (2,5 vezes) e K⁺-ATPase (2,5 vezes); essas são as principais enzimas que participam da excreção ativa de amônia. O Western blotting de homogeneizados microsomais branquiais de camarões recém capturados mostrou uma única banda imunorreativa de ≈120 kDa, correspondendo à subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase. Os camarões expostos a amônia também exibiram uma banda difusa fraca de ≈130 kDa. A afinidade da (Na⁺, K⁺)-ATPase branquial para todos os moduladores, exceto NH₄⁺, não foi alterada após a exposição à amônia;

para NH_4^+ , a afinidade aumentou 2,5 vezes nos camarões expostos à amônia. As interações sítio-sítio foram observadas para todos os moduladores, exceto ATP, em camarões recém-capturados e expostos a amônia. Embora a exposição à amônia por 10 dias não tenha causado mortalidade, letargia ou outras manifestações, mais estudos são necessários para estabelecer a concentração tóxica máxima aceitável de amônia de *M. amazonicum* para fins de aquicultura.

Palavras Chave: Toxicidade. Amônia. Carcinicultura. Dulcicola. Concentração. (Na,K)-ATPase braquial.

ABSTRACT

Water quality is essential for the success of the aquaculture activity. In the case of freshwater shrimp farming, ammonia concentrations can increase considerably, even when the growing water is frequently renewed, increasing the risk of poisoning by this nitrogenous compound. *Macrobrachium amazonicum* has a relevant importance in ecology, in the chain, being widely fished and consumed in the Northeast region, this species has been used as a biomarker of the quality of water bodies and as a model organism for physiological, biochemical and molecular studies among the which we can mention: the evaluation of the effect of different salinities on larval survival and molting, the role of amino acids and salinity tolerance at different ontogenetic stages, the kinetic characterization of the (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in adults and in different ontogenetic stages, the kinetic characterization of the K⁺-phosphatase activity of (Na⁺, K⁺)-ATPase under different salinity conditions, the ultrastructural characterization of the gills, the effect of medium salinity on the activity and expression of (Na⁺, K⁺)-ATPase and V(H⁺)-ATPase, the effects of the presence of ammonia in the medium on different transporters and oxidative stress enzymes, the kinetic characterization of V(H⁺)-ATPase activity at different ontogenetic stages, regulation of (Na⁺, K⁺)-ATPase activity by exogenous biogenic amines (Lucena et al., and regulation of (Na⁺, K⁺)-ATPase phosphorylation/dephosphorylation by exogenous biogenic amines. We investigated the ammonia lethality (LC50-96 h) in a hololimnetic population of the shrimp *Macrobrachium amazonicum* from the Paraná River / Paraguay Basin and the effects of a 'safe' ammonia concentration on the (Na⁺, K⁺)-ATPase activity of the gill. The mean lethal ammonia concentration during 96 h of exposure for this population was estimated to be 49.27 mg L⁻¹ of total ammonia or 1.8 mg L⁻¹ of non-ionized ammonia. This value is higher than that of populations from the Amazon River Basin and of *M. rosenbergii* and is comparable to those of marine crustaceans. The 'safe' level was calculated as 4.9 mg L⁻¹ of total ammonia. Exposure of *M. amazonicum* to safe concentrations of ammonia (4.9 mg L⁻¹ of total ammonia) for 10 days increased the activity of gill enzymes such as (Na⁺, K⁺)-ATPase (1.3 times), V (H⁺)-ATPase (2.5 times) and K⁺-ATPase (2.5 times); these are the main enzymes that participate in the active excretion of ammonia. Western blotting of freshly captured gill microsomal homogenates from freshly captured shrimp showed a single immunoreactive band of ≈120 kDa, corresponding to the (Na⁺, K⁺)-ATPase α subunit. Shrimp exposed to ammonia also exhibited a weak diffuse band of ≈130 kDa. The affinity of gill (Na⁺, K⁺)-ATPase for all modulators except NH₄⁺ was not changed after exposure to ammonia; for

NH_4^+ , the affinity increased 2.5 times in shrimp exposed to ammonia. Site-site interactions were observed for all modulators, except ATP, in freshly caught shrimp and exposed to ammonia. Although exposure to ammonia for 10 days did not cause mortality, lethargy or other manifestations, further studies are needed to establish the maximum acceptable toxic concentration of *M. amazonicum* ammonia for aquaculture purposes.

Keywords: Toxicity. Ammonia. Shrimp farming. Sweetcola. Concentration. (Na,K)-Brachial ATPase.

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Painel 1	<i>Macrobrachium amazonicum</i>	16
Painel 2	Arquitetura do complexo $\alpha\beta\gamma$ da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da glândula retal de tubarão ligada a K^+ e MgF_4^{2-}	21
Painel 3	Esquema integrado do ciclo funcional da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$	22
Painel 4	Diagrama da ligação da ouabaína à $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e estrutura química da ouabaína	23
Painel 5	Representação da câmara branquial de <i>Macrobrachium olfersii</i>	26
Painel 6	Modelo de hiper/hipoosmorregulação em camarões palemonídeos	28
Painel 7	Modelo para excreção branquial de <i>Carcinus maenas</i>	32
Figura 1	Regressão logística da LC_{50} para adultos de <i>M. amazonicum</i> depois de 96h expostos a amônia total	48
Figura 2	Efeito da concentração de ATP na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de <i>Macrobrachium amazonicum</i> recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias	52
Figura 3	Efeito da concentração de Mg^+ na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de <i>Macrobrachium amazonicum</i> recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias	53
Figura 4	Efeito da concentração de Na^+ na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias	54
Figura 5	Efeito da concentração de K^+ na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de <i>Macrobrachium amazonicum</i> recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias	55
Figura 6	Efeito da concentração de NH_4^+ na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias	56
Figura 7	Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias	59
Figura 8	SDS-PAGE e Western blotting da fração microsomal do tecido branquial de <i>M. amazonicum</i> recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg : micrograma

μL : microlitro

ADP: difosfato de adenosina

Amônia total: amônia não-ionizada + amônia ionizada

ATP: trifosfato de adenosina

ATPase: adenosina-trifosfatase, enzima capaz de hidrolisar o trifosfato de adenosina

CaCO_3 : carbonato de cálcio

Cl^- : ânion cloreto

Da: Dalton

EDTA: ácido etilenodiamino-tetra acético

FEP: fosfoenolpiruvato

FGQ: fosfoglicerato quinase

GAF: 3-fosfogliceraldeído

GAFDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

H^+ : próton, cátion hidrogênio

K^+ : cátion potássio

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

K_I : constante de inibição

K_M : constante de Michaelis-Menten

$\text{LC}_{50-96\text{h}}$: concentração letal média em 96 horas

LDH: lactato desidrogenase

$\text{Mg}\cdot\text{ATP}$: complexo formado entre ATP e íons Magnésio.

Mg^{2+} : cátion magnésio

Na^+ : cátion sódio

NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH : nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

$(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$: adenosina-trifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio, bomba de sódio da família das ATPases tipo P

n_H : número de Hill

NH_3 : amônia não-ionizada

NH_4^+ : cátion amônio ou amônia ionizada

nmol: nano mol

pH: potencial hidrogeniônico

Pi: fosfato inorgânico

pKa: logaritmo negativo da constante de dissociação de um ácido

PQ: piruvato quinase

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

r^2 = coeficiente de determinação de reta

SDS-PAGE: eletroforese de poliacrilamida em condições desnaturantes

U: Unidade de atividade enzimática

v: velocidade inicial

V_M : velocidade máxima

α : 1) alfa; 2) subunidade alfa (catalítica, constitutiva) da adenosina-trifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio

β : 1) beta; 2) subunidade beta (chaperona, constitutiva) da adenosina-trifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio

γ : 1) gama; 2) terceira subunidade (= FXYD) (chaperona, de expressão variável) da adenosinatrifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio

FXYD: família de proteína que possuem a sequência de aminoácidos: Phe-X-Tyr-Asp

ϵ : coeficiente de extinção molar

SUMÁRIO

1	Introdução	16
1.1	Camarão <i>Macrobrachium amazonicum</i>	16
1.2	Aquacultura de <i>Macrobrachium amazonicum</i>	18
1.3	(Na ⁺ , K ⁺)-ATPase	22
1.4	A osmorregulação em crustáceos	27
1.5	Toxicidade por amônia	31
2	Objetivo	36
2.1	Objetivo geral	36
2.2	Objetivos específicos	36
3	Materiais e Métodos	37
3.1	Materiais	37
3.2	Coleta dos animais	38
3.3	Determinação da LC ₅₀ -96H	39
3.4	Análises de qualidade da água	40
3.5	Dosagem de amônia	40
3.6	Preparação Microsomal	41
3.7	Dosagem de proteína	42
3.8	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida	42
3.9	Western blotting	42
3.10	Determinação da atividade (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase da fração microsomal	43
3.11	Cálculo de espécies livres no meio de reação	44
3.12	Tratamento dos dados cinéticos	44
3.13	Análise estatística	45
4	Resultado	45
4.1	Determinação da LC ₅₀ -96h	45
4.2	Caracterização cinética da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase	47
4.3	Eletroforese e Western blotting	57
5	Discussão	62
6	Referencias	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 CAMARÃO MACROBRACHIUM AMAZONICUM

As espécies de camarões do gênero *Macrobrachium*, que pertencem à família dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) evoluíram de um ancestral marinho comum que migrou para águas continentais, no início do Pleistoceno (Jalihal et al., 1993; Short, 2004; Freire et al., 2003; McNamara; Faria, 2012). Acredita-se que a migração ocorreu mais de uma vez, já que seus membros são encontrados desde águas marinhas até águas interiores (Jalihal et al., 1981; Freire et al., 2003), habitando regiões tropicais e subtropicais do mundo (Bate, 1868). Atualmente existem 244 espécies do gênero *Macrobrachium* conhecidas no mundo, das quais 19 estão registradas no Brasil e 46 nas Américas (De Grave; Fransen, 2011; Dos Santos et al., 2013; Vera-Silva et al., 2016).

Os diferentes padrões de desenvolvimento dentro do gênero *Macrobrachium* são atribuídos aos vários eventos migratórios para o ambiente dulcícola e divide as espécies em *hololimnéticas* (animais que permanecem toda sua fase de vida em ambiente dulcícola) e *diádromas* (espécies de animais que migram de água doce para salgada ou vice-versa) como é o caso de *M. amazonicum* (Jalihal et al., 1993; Freire et al., 2003; McNamara et al., 2004).

Macrobrachium amazonicum (Painel 1), também conhecido como camarão canela, está largamente alastrado na América do Sul, sobrevivendo facilmente nas bacias dos rios Orinoco, Amazonas, São Francisco e Paraguai (revisto por Magalhães et al., 2005). As populações de *M. amazonicum* são consideradas naturais, com exceção das encontradas na parte superior da bacia do Rio Paraná e no nordeste do Brasil que são resultados de uma dispersão antrópica (Pinto, 1977; Torloni et al., 1993; Magalhães et al., 2005). *M. amazonicum* ocupa uma diversidade de ambientes, sendo encontrado em águas interiores a mais de 3.000 km do mar até em regiões estuarinas (Odinetz-Collart e Rabelo, 1996; Montoya, 2003; Magalhães et al., 2005; Bentes et al., 2011). No Brasil, suas populações apresentam diferentes características biológicas quanto à fecundidade, proporção macho/fêmea, número de fases larvais e quanto à capacidade osmorregulatória (Anger et al., 2009; Maciel; Valenti, 2009; Charmantier; Anger, 2011; Hayd; Anger, 2013), entretanto a caracterização genética de diferentes populações, baseada nos marcadores moleculares 16S e COI do DNA mitocondrial, revelou que estas populações formam um clado monofilético, suportando a existência de uma única espécie (Pileggi e Mantelatto, 2010; Vergamini et al., 2011). Estas análises também revelaram que existe

uma divergência genética resultante de uma variabilidade intraespécie e que permite estruturar as populações brasileiras em três grupos: I- populações de águas interiores da bacia Amazônica, II – populações das bacias do Paraná e Paraguai, e III- populações costeiras (Vergamini et al., 2011). Assim, a ampla variabilidade intraespécies pode ser devido à isolamento genética das populações e é possivelmente um sinal de um incipiente processo de especiação (Anger et al., 2009; Vergamini et al., 2011).

Painel 1 - Espécime de *Macrobrachium amazonicum*.



Fonte: Maciel e Valenti, 2009.

Vários estudos mostram que a população de *M. amazonicum* do Pantanal não está conectada hidrograficamente com as demais populações, impedindo o fluxo gênico e, além disso, apresenta algumas diferenças em relação às demais populações. Essas diferenças são quanto à composição química e tamanho das larvas (Anger et al, 2009), aos padrões de alimentação (Anger; Hayd, 2010), aos padrões de osmorregulação durante o desenvolvimento ontogenético (Charmantier; Anger, 2011) e à outras características morfológicas, ecológicas, fisiológicas e reprodutivas (Hayd; Anger, 2013). Baseado nesse conjunto de caracteres morfológicos, a população do Pantanal está sendo sugerida como uma nova espécie que será denominada *Macrobrachium pantanalense* (Dos Santos et al., 2013).

É importante destacar a importância ecológica de *M. amazonicum* na cadeia alimentar (Boscolo et al., 2004), sendo amplamente pescado e consumido na região Nordeste (Moraes-Riodades e Valenti, 2001, 2004; Marques e Moraes-Valenti, 2012).

Esta espécie vem sendo usada como um biomarcador da qualidade de corpos d'água (Coler et al., 1999) e como organismo modelo para estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares dentre os quais podemos citar: a avaliação do efeito de diferentes salinidades na sobrevivência e na muda de larvas (McNamara et al., 1983), o papel dos aminoácidos e a tolerância à salinidade em diferentes estágios ontogenéticos (Augusto et al., 2007; 2009), a caracterização cinética da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase em indivíduos adultos e em diferentes estágios ontogenéticos (Santos et al., 2007; Leone et al., 2012; 2014; Fabri et al., 2019), a caracterização cinética da atividade K⁺-fosfatase da (Na⁺, K⁺)-ATPase em diferentes condições de salinidade (Belli et al., 2009), a caracterização ultraestrutural das brânquias (Belli et al., 2009; Faleiros et al., 2010), o efeito da salinidade do meio na atividade e expressão de (Na⁺, K⁺)-ATPase e V(H⁺)-ATPase (Faleiros et al., 2010), os efeitos da presença de amônia no meio em diferentes transportadores e enzimas do estresse oxidativo (Pinto et al., 2016), a caracterização cinética da atividade V(H⁺)-ATPase em diferentes estágios ontogenéticos (Lucena et al., 2015), a regulação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase por amins biogênicas exógenas (Lucena et al., 2017a; Lucena et al., 2019) e regulação da fosforilação/desfosforilação da (Na⁺, K⁺)-ATPase por amins biogênicas exógenas (Lucena et al., 2017b).

1.2 AQUACULTURA DE MACROBRACHIUM AMAZONICUM

A aquicultura no mundo vem apresentando expressivo crescimento nos últimos anos, principalmente a carcinicultura dulcícola. Atividade que desempenha um importante papel socioeconômico, gerando condições para um aproveitamento mais efetivo dos recursos locais, além de ser muito lucrativa. Segundo os dados da FAO (2018) a produção mundial de camarões do gênero *Macrobrachium* cresceu aproximadamente 22% entre os anos de 2006 e 2016 e no ano de 2016 foram produzidas cerca de 506,6 mil toneladas gerando ~US\$ 4,2 milhões.

No Brasil a carcinicultura está embasado em espécies exóticas como o *Macrobrachium rosenbergii* e o *Litopenaeus vannamei*, inspirando preocupação com riscos potenciais, como o surgimento de novas doenças, que podem causar colapso ao setor produtivo, e problemas ambientais decorrente de sua liberação acidental no ambiente natural, podendo causar competição e/ou predação em relação às espécies

nativas, alterações de habitats e disseminação de patógenos (Bridger e Garber, 2002; Myrick, 2002).

Dentre as espécies de camarão de água doce nativa do Brasil, *M. amazonicum* é a que apresenta maior potencial para a aquicultura (Moraes-Riodades e Valenti, 1999; Kutty et al. 2000; Valenti et al. 2021). Uma vez que apresenta período larval relativamente curto; crescimento rápido, podendo alcançar até 16 cm e 30 g; resistência a doenças; alta taxa de sobrevivência; fácil manutenção; reprodução contínua ao longo de todas as estações do ano e a possibilidade de produção de larvas em salinidades de apenas 1 ‰, permitindo a sua produção em regiões interiores próximas das fazendas de engorda (Valentiet al., 2003; Moraes-Valenti e Valenti, 2010; Marques e Moraes-Valenti, 2012; Sampaio et al., 2007; Pantaleão et al., 2018). *M. amazonicum* adultos apresentam um aproveitamento maior de carcaça, por terem abdômen maior que o cefalotórax. Sua carne com textura consistente, apresenta sabor mais acentuado, o que mostra melhor aceitação nos mercados consumidores (Moraes-Riodades e Valenti 1999).

A dieta dos camarões de água doce é essencialmente constituída por restos de animais e vegetais bem como vegetais vivos em condições naturais (Moraes-Valenti e Valenti, 2009) que são encontrados em seu habitat. Porém para o cultivo intensivo o alimento deve ser fornecido, e deve suprir totalmente ou pelo menos a maior parte de suas necessidades nutricionais (Rovero et al., 1990).

A ração chega a ser responsável por até 50% do custo de produção (Rhodes, 2000) no cultivo de camarão. A farinha de peixe é a matéria prima mais utilizada, sendo a principal fonte de proteína animal, tendo um perfil de aminoácido mais próximo das necessidades no cultivo de peixes e camarões (Pezzato et al., 2002). Atualmente com a diminuição da pesca extrativista, a farinha de peixe tem se tornado um dos ingredientes mais caros na dieta do camarão. Cerca de 68% de todo o farelo de peixe produzido no mundo é usado na aquicultura (Tacon; Metian, 2009). O alto custo da farinha de peixe realça a importância de determinar as necessidades nutricionais das espécies cultivadas, a fim de promover a sustentabilidade na aquicultura com o uso racional deste insumo podendo reduzir o desperdício de ração (Herbeck et al., 2013). Portanto, a substituição do farelo de peixe por uma fonte proteica vegetal aliviaria a pressão sobre os estoques pesqueiros, contribuindo para uma redução dos custos de produção. (Abe et al., 2008; Valle et al., 2015). O uso de farelo de soja é justificado, pois dentre as proteínas de origem vegetal é a que possui melhor perfil de aminoácidos, embora seja deficiente em aminoácidos com enxofre (metionina e cisteína) (Gatlin et al., 2007). Assim, é possível

incluir até 30% de farelo de soja em substituição à farinha de peixe sem comprometer o desempenho produtivo de *M. amazonicum* (Cagol et al., 2018)

A criação de camarão pode ser desenvolvida no sistema de monocultivo ou policultivo. O monocultivo pode ser desenvolvido em propriedades de diferentes tamanhos, sendo bastante lucrativa em regiões sem limitações climáticas (tropicais). No policultivo são cultivadas espécies com costumes alimentares distintos e que preferencialmente ocupem diferentes espaços na coluna d'água. O objetivo principal é o aproveitamento do alimento existente no viveiro sem que as espécies venham a concorrer pelos recursos (Contreas et al., 2003).

A carcinicultura, incluindo a carcinicultura de água doce, abrange três fases distintas: larvicultura, berçário e crescimento final (engorda). A larvicultura abrange a obtenção e o desenvolvimento das larvas até a metamorfose em pós-larvas (PL), caracterizada por ser um sistema intensivo. As larvas são criadas em tanques de tamanhos variados (1 a 10 m³), cheios com água salobra (12 a 16 %). Em condições controladas, atualmente, existe uma tendência mundial na utilização do Sistema Fechado Dinâmico, garantindo níveis baixos de amônia e nitrito (Valenti et al., 1998; Valenti e Daniels, 2000). Na fase de berçário, as PL são armazenadas em tanques ou viveiros por 15 a 60 dias até atingem o estágio de juvenil. O cultivo em tanques-rede é bastante favorável, economizando área de produção e gastos com o manejo. Essa fase pode ser suprimida, porém a sobrevivência é de 60 a 70% para a pós larva. Enquanto para o Juvenil a sobrevivência vai de 80 a 90% quando passados para a fase final de engorda (Marques et al. 2000). No desenvolvimento final (engorda) os juvenis são colocados em viveiros de água doce com fundo de terra até atingirem o tamanho adequado para sua comercialização. Na maioria das vezes o cultivo varia de 4 a 8 meses, dependendo da temperatura, quantidade e qualidade da ração (Marques et al. 2000).

A qualidade da água dos viveiros é fundamental para o sucesso da aquicultura, seu monitoramento contribui para alcançar bons índices de produtividade. Entre as variáveis mais importantes que mede a qualidade da água estão o oxigênio dissolvido e onitrogênio amoniacal. (Boyd e Zimmermann, 2000; Kubitzka, 2003).

Mudanças nas temperaturas ambientais também influenciam na sobrevivência e no crescimento do camarão de água doce, pois reduz os níveis de oxigênio, pH e condutividade. Espécies de *Macrobrachium* têm uma ampla tolerância a temperatura que varia de 13 a 43 ° C (Manush et al., 2004). *M. amazonicum* são encontrados em ecossistemas de água doce com temperaturas variando de 26 a 31 °C (Rocha et al.,2015).

Os compostos nitrogenados possuem grande importância no ambiente aquático natural e artificial. O principal papel está relacionado aos processos metabólicos e na formação de proteínas, por serem componentes básicos da biomassa. Quando em quantidades diminutas nos ecossistemas aquáticos, atuam como fator limitante para a produção primária (Esteves, 1998). O nitrogênio está presente como nitrogênio orgânico dissolvido (ureia, peptídeos, purinas, aminas, aminoácidos, etc.), nitrogênio orgânico particulado (bactérias, fitoplâncton, zooplâncton e detritos), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amônia (NH_3), íon amônio (NH_4^+), óxido nitroso (N_2O) e nitrogênio molecular (N_2).

O nitrogênio amoniacal (amônia total) é o resíduo nitrogenado excretado pelos camarões, derivado da oxidação das proteínas (aminoácidos) da dieta. A ingestão de alimentos com excessivo teor proteico ou com desbalanço na sua composição de aminoácidos aumenta a excreção de amônia pelos camarões. Outra fonte importante de amônia no cultivo é a decomposição microbiana dos aminoácidos e proteínas eliminados nas fezes. A amônia é tóxica aos camarões, o que força a adoção de estratégias para evitar seu acúmulo na água do cultivo ao longo tempo (Kubitza, 2003).

O nitrato é considerado uma substância com baixa toxicidade (Thurston et al. 1986), porém por ser o produto final da nitrificação, pode se acumular em grandes quantidades, causando efeitos letais ou sub letais em diferentes organismos, ou atuando sinergicamente com outras formas nitrogenadas (Ostrensky; Wasielesky 1995). Como é considerado um composto nitrogenado de baixa toxicidade, poucos são os estudos sobre o assunto (Kaiser; Wheaton, 1983; Russo, 1991; Stormer et al., 1996).

Nitrito é o composto mediador na nitrificação bacteriana da amônia a nitrato, geralmente apresenta alta toxicidade, dependendo do estágio de desenvolvimento do organismo e de sua concentração no ambiente (Miranda-Filho et al., 1995).

Amônia, composto nitrogenado que sobrevém naturalmente no ambiente (Martín; Frederico, 2001), pode ser induzida também pela poluição doméstica, industrial, agrícola e por mudanças ambientais (de Freitas Rebelo et al., 2000). É o principal produto gerado pelo catabolismo proteico da maioria dos organismos aquáticos. A amônia (NH_3), por se difundir facilmente através da membrana plasmática é considerada a forma mais tóxica (Weihrauch et al., 2004). Existem evidências que crustáceos podem excretar ativamente amônio pelas brânquias, até mesmo contra o gradiente de concentração, utilizando a (Na^+ , K^+) - ATPase (Weihrauch et al., 2004; Masui et al., 2005; Garçon et al., 2009).

Diante do potencial desta espécie, é importante a geração de estudos que forneçam informações para subsidiar técnicas de produção, seja através dos sistemas de cultivo comercial ou da exploração racional dos estoques naturais, evitando risco do seu esgotamento (Moraes-Riodades et al. 1999). Assim, é possível que haja uma avaliação do potencial de cada espécie para a produção, assim como, o aprimoramento de técnicas que melhorem seu cultivo e aumentem os lucros (Valenti et al. 2003).

1.3 (Na⁺,K⁺)-ATPase

A (Na⁺, K⁺)-ATPase (E.C. 7.2.2.13), conhecida também por bomba de sódio e potássio ou adenosina trifosfatase estimulada por sódio e potássio (Painel 2), realiza o transporte de três Na⁺ para o meio extracelular, simultaneamente ao transporte de dois K⁺ para o meio intracelular utilizando a energia fornecida pela hidrólise do fosfato γ do ATP (Skou, 1957). Esse transporte ativo assimétrico energiza a membrana plasmática de uma infinidade de células animais, fornecendo força motriz para a regulação do volume celular, transporte ativo secundário, manutenção do balanço iônico, regulação do pH, sinalização neural, transporte de substâncias vitais como a glicose (Martin, 2005; Pedersen, 2007; Poulsen et al., 2010; Clausen et al., 2017; Pivovarov et al., 2019).

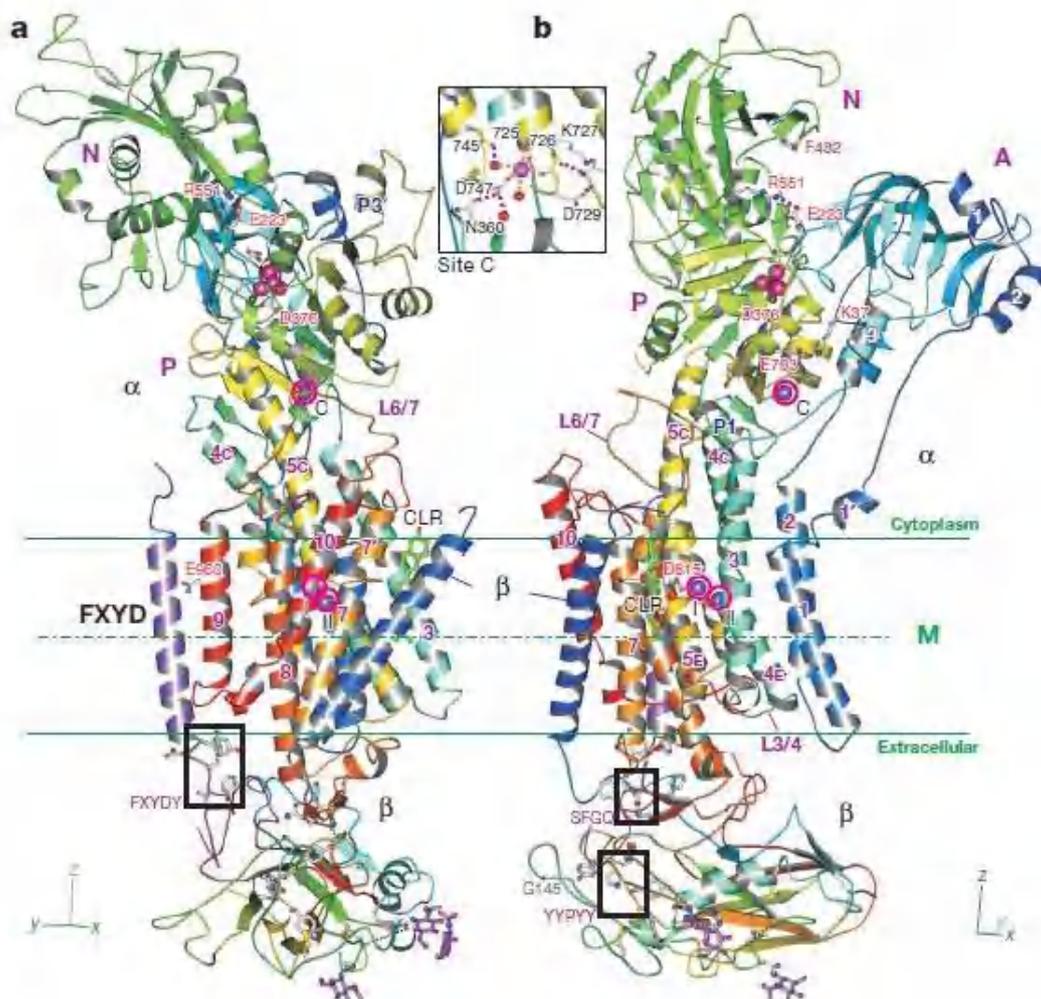
A unidade funcional básica da (Na⁺, K⁺)-ATPase é composta por duas subunidades. A subunidade α , formada por 10 segmentos transmembrana, é considerada a subunidade catalítica da enzima, possuindo o sítio de ligação para o ATP, o resíduo de aspartato fosforilado durante o ciclo catalítico e os resíduos de aminoácidos essenciais para a ligação de Na⁺ e K⁺ (Kaplan, 2002; Horisberg, 2004; Morth et al., 2007, 2011; Palmgren e Nilsen, 2011) e a subunidade β , que atua como chaperona (sem essa subunidade α é retida no retículo endoplasmática) é uma proteína de membrana do tipo II, altamente glicosilada (conferindo resistência da (Na⁺, K⁺)-ATPase à proteases) que influencia a afinidade da enzima por Na⁺ e K⁺ devido a interação do domínio YXXYF à subunidade α (Morth et al., 2007, 2011; Shinoda et al., 2009; Toustrup-Jensen et al., 2009).

Em alguns organismos essa unidade funcional básica está associada a um terceiro polipeptídeo pertencente a famílias das proteínas FXYD (Kaplan, 2002; Morth et al., 2007; Geering, 2008; Clausen et al., 2017). Essas proteínas são expressas de modo tecido e espécie-específica associadas à (Na⁺, K⁺)-ATPase, modulando suas propriedades

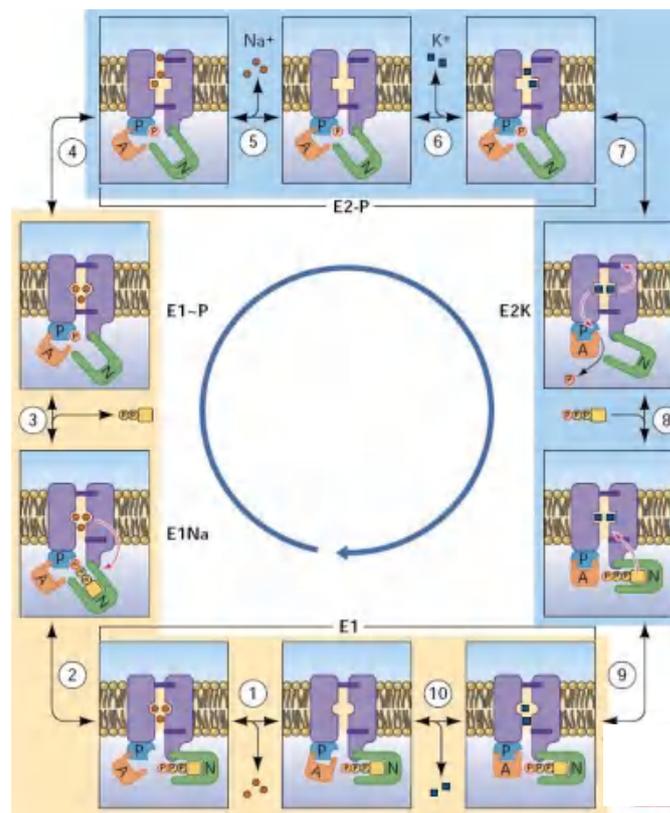
cinéticas e estabilidade (Crambert et al., 2004; Füzesi et al., 2005; Silva et al., 2012; Clausen et al., 2017; Pirkmajer e Chibalin, 2019).

O modelo Alberts-Post é o mais aceito para explicar o ciclo catalítico da (Na^+ , K^+)-ATPase. Baseia-se na transição conformacional entre dois estados, denominados E1 e E2 (Alberts, 1967; Post et al., 1972). A forma E1 expõe os sítios de ligação dos cátions para a região intracelular, possuindo alta afinidade por Na^+ e ATP, enquanto a forma E2 expõe os sítios de cátions ao lado extracelular e possui alta afinidade por K^+ (Kaplan, 2002; Scheiner-Bobis, 2002; Horisberg, 2004; Clarke, 2009; Khalid et al., 2014).

Painel 2 - Arquitetura do complexo $\alpha\beta\gamma$ da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da glândula retal de tubarão ligada a K^+ e MgF_4^{2-} . As cores mudam gradualmente entre a extremidade aminoterminal (azul) e carboxiterminal (vermelho) para a subunidade α e β , a subunidade γ está apresentada em roxo. CLR representa a molécula de colesterol. A linha verde representa o limite hidrofóbico da bicamada lipídica



Fonte: Adaptado de Shinoda et al, 2009.

Painel 3 - Esquema integrado do ciclo funcional da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$.

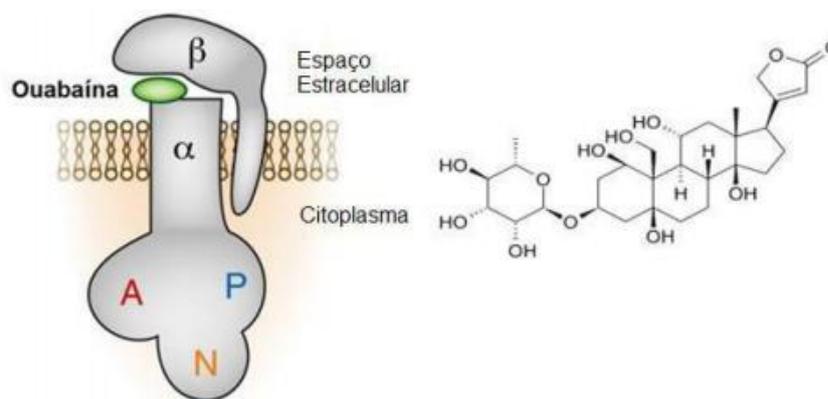
Fonte: Horisberger, 2004.

De acordo com o modelo acima, que é baseado do modelo de Alberts-Post, figura 3, a enzima na forma $E_1\text{ATP}$ apresenta seus domínios citoplasmáticos A, N e P afastados (etapa ①). Após a ligação dos três Na^+ extracelulares aos seus sítios com alta afinidade, ocorre uma mudança de conformação importante. Após uma grande rotação o domínio N posiciona o fosfato γ do ATP próximo ao sítio de fosforilação (etapa ②). A hidrólise do ATP é acoplada a transferência do fosfato γ para o resíduo de aspartato que sofre fosforilação durante o ciclo reacional, dando origem à forma $E_1\text{P}(3\text{Na})$ (etapa ③). Simultaneamente o domínio A também sofre rotação de aproximadamente 30° , (etapa ③), induzindo uma mudança conformacional no interior do domínio transmembrana, resultando no fechamento do canal transiente e oclusão dos Na^+ ligados à enzima (Toyoshima e Mizutani, 2004; Sorensen et al., 2004). Durante o ciclo catalítico, este estado de alta energia $E_1\text{P}(3\text{Na})$ é rapidamente convertido em $E_2\text{P}(2\text{Na})$ (etapa ④). Concomitantemente à conversão de E_1 para E_2 ocorre a exposição dos sítios de ligação de cátions para o meio extracelular. A redistribuição dos grupos diminui a afinidade pelo Na^+ e a liberação do primeiro Na^+ para o meio extracelular provoca um rearranjo do canal

liberando os outros dois Na^+ (etapa ⑤). O sítio de ligação de cátions da forma E_2P é então ocupado por dois K^+ extracelulares (etapa ⑥), resultando na desfosforilação do domínio P e na oclusão dos íons ligados, devido ao fechamento do canal transiente voltado para o meio extracelular (etapa ⑦). A ligação de uma nova molécula de ATP ao domínio N (etapa ⑧) promove o afastamento dos domínios N e P, que induz uma movimentação dos segmentos transmembrana da molécula, resultando na abertura do canal transiente e liberando o acesso aos sítios de ligação de cátions do meio intracelular. Um rearranjo dos grupos importantes para a coordenação dos cátions, traduzido pela diminuição da afinidade da enzima pelo K^+ , caracteriza a transição conformacional da forma $\text{E}_2\text{ATP}(2\text{K})$ para a forma $\text{E}_1\text{ATP}2\text{K}$ (etapa ⑩). A próxima etapa (⑩) é a liberação dos K^+ para o citosol, finalizando o ciclo de bombeamento (Horisberger, 2004).

A $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{-ATPase}$ é especificamente inibida por glicosídeo cardiotônicos, que ao se ligar especificamente a enzima atua fisiologicamente como moduladores de atividade. A ouabaína (Painel4), glicosídeo cardiotônico mais estudado, se liga com baixa afinidade à forma $\text{E}_2\text{-}2\text{K}^+$ (Aperia, 2012; Ogawa et al., 2009) ou com alta afinidade a forma E_2P (Yatime et al., 2011; Laursen et al., 2013; 2015; Slingerland et al., 2013), inibindo especificamente a atividade catalítica e de transporte iônico (Cornelius et al., 2013).

Painel 4 - Diagrama da ligação da ouabaína à $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{-ATPase}$ e estrutura química da ouabaína.



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

A regulação tanto a curto quanto a longo prazo da $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{-ATPase}$ ocorre através de uma série de hormônios e outras moléculas tais como fosfatases (El-Beialy et al., 2010), insulina (Oubaassine et al., 2012), aldosterona (Phakdeekitcharoen et al., 2011;

Salyer et al., 2013), cascatas envolvendo proteínas quinases A (Lecuona et al., 2013) e C (Gallo et al., 2010; Wengert et al., 2013), hormônios da tireoide (Phakdeekitcharoen et al., 2007), progesterona (Cochrane et al., 2012; Deng et al., 2013) e glicocorticoides (Clausen, 2003; Pirkmajer e Chibalin, 2016). Inibidores endógenos semelhantes à ouabaína, as endobaínas, também são importantes na regulação da enzima (Therien e Blostein, 2000; Scheiner-Bobis, 2002; Hansen, 2003).

1.4 A OSMORREGULAÇÃO EM CRUSTÁCEOS

Os crustáceos surgiram no mar e durante a evolução invadiram ambientes de menor salinidade (Schubart et al., 1998). A transição para ambientes dulcícolas constitui um grande desafio osmótico e iônico, devido a tendência em perder íons por difusão e ganhar água por osmose (Péqueux, 1995). A sobrevivência desses animais em águas menos salgada é determinada pela capacidade osmorregulatória de cada espécie que é definida como a manutenção dos fluidos corporais da hemolinfa com relação as concentrações do meio externo (Charmantier; Soye, 1994).

Levando em consideração à capacidade de sobrevivência dos crustáceos em ambientes de diferentes salinidades, esses podem ser classificados como estenoalinos (toleram pequenas variações na salinidade do meio externo) e os que toleram grandes variações da salinidade do meio são denominados eurialinos (Péqueux, 1995; Randall et al., 2000). Em relação à variação da concentração osmótica da hemolinfa comparada à do meio externo, os crustáceos são denominados osmoconformadores, quando mantêm a concentração osmótica da hemolinfa semelhante à do ambiente, ou osmorreguladores, a concentração osmótica da hemolinfa é mantida dentro de certos limites que são espécie-específicos e que podem estar abaixo (hiporregulação) ou acima (hiperregulação) daquela encontrada no meio externo (Péqueux, 1995; Lucu e Towle, 2003). Os crustáceos hiperreguladores podem ser divididos em dois grupos: os reguladores fortes, capazes de hiperregular fortemente em água doce e passar toda a vida adulta neste ambiente, e os reguladores fracos que, embora sejam capazes de viver e hiperregular em meios diluídos, sobrevivem mal em água doce (Péqueux, 1995; Lucu et al., 2000; Freire et al., 2008).

Em sua grande maioria, os crustáceos marinhos são classificados como osmoconformadores e estenoalinos, enquanto as espécies estuarinas se apresentam como eurialinos e osmorreguladores fracos (Péqueux, 1995; Schubart e Diesel, 1998; Thabet et

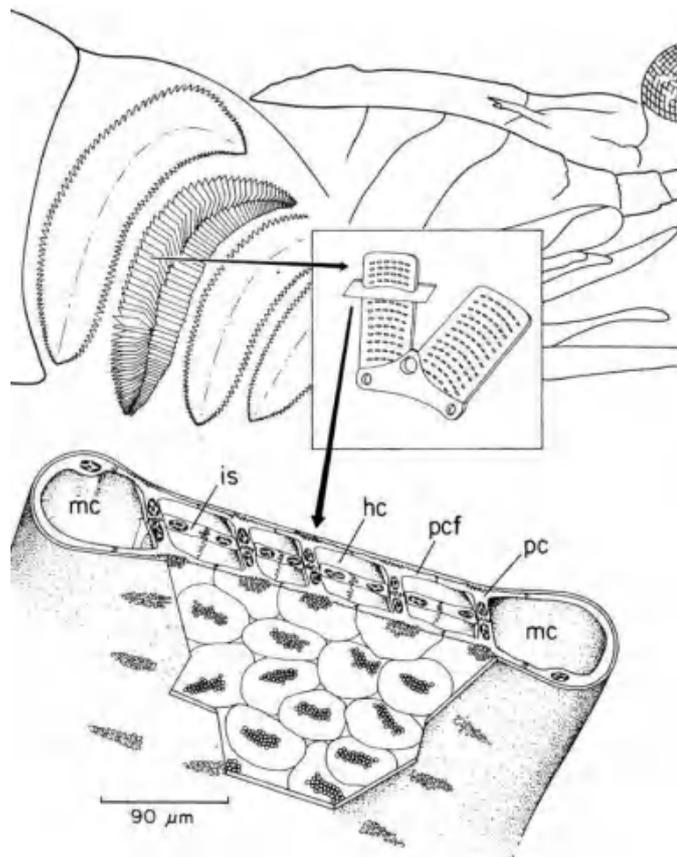
al., 2017). Dentre as características que permitem aos crustáceos adentrarem ambientes de menor salinidade estão a diminuição da permeabilidade à água do meio externo, aumento da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase, anidrase carbônica e V-ATPase (Thebet et al., 2017). Essa diversificação nos padrões osmorregulatórios é resultado da variação genética e seleção natural a que as espécies foram submetidas ao longo do processo evolutivo (Péqueux, 1995; Onken e McNamara, 2002; Lucu e Towle, 2003; McNamara e Faria, 2012). As brânquias são consideradas os sítios primários para regulação osmótica e iônica e ainda participam desse processo o intestino e as glândulas antenais (Péqueux, 1995; Palacios e Racotta, 2007; Thabet et al., 2017).

Além do controle da osmolalidade da hemolinfa nos crustáceos, as brânquias também estão envolvidas na regulação do pH, trocas gasosas e excreção de compostos nitrogenados (Weihrauch et al., 2004; Weihrauch e O'Donnell, 2015). As brânquias de camarões palemonídeos são do tipo filobrânquias, onde não ocorre diferenciação morfológica entre anteriores e posteriores, como visto para filobrânquias de brachyura (Onken e Riestenpatt, 1998; Freire et al., 2008). As filobrânquias desempenham as funções de trocas gasosas e transporte iônico, enquanto o epitélio branquial apresenta um septo intralamelar bem desenvolvido e não fenestrado (Freire; McNamara, 1995; Belli et al., 2009). As células pilares estão ligadas as células do septo criando dois compartimentos que dirige o fluxo da hemolinfa do canal marginal aferentes para o eferente (Freire; McNamara, 1995; Belli et al., 2009). Os ionócitos, que são células especializadas em transporte iônico, apresentam invaginações basais ricas em mitocôndrias e invaginações apicais formando o espaço subcuticular e uma cutícula robusta (Taylor e Taylor, 1992). A representação esquemática da câmara branquial de *M. olfersii* está mostrado no Painel 5.

A osmolalidade da hemolinfa dos crustáceos é composta principalmente por íons Na⁺ e Cl⁻ (aproximadamente 80%), sendo essencial a presença de outros íons traço como K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ que possibilitam a funcionalidade de vários transportadores, como a atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase, anidrase carbônica, trocador Na⁺/K⁺ e cotransportador Na⁺/K⁺/2Cl⁻. Embora os aminoácidos livres da hemolinfa (FAA) sejam osmólitos orgânicos que desempenham um papel na manutenção da pressão osmótica, sendo particularmente importante em salinidades mais elevadas, a contribuição é substancialmente menor (Romano; Zeng, 2012). Assim, a manutenção da osmolalidade da hemolinfa de crustáceos de água doce depende do movimento transbranquial do Na⁺ e Cl⁻ (Péqueux, 1995; Freire et al., 2008; Henry et al., 2012). As principais proteínas com

função regulatória são a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$, trocador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, canais de Cl^- , canais de K^+ , trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, trocador Na^+/H^+ , além da enzima citosólica anidrase carbônica (Freire et al., 2008; Sáez et al., 2009; Towle et al., 2011; Rahi et al., 2017). A distribuição destes transportadores depende da espécie e da salinidade do ambiente. O Painel 6 representa um mecanismo hipotético de hiper/hiposmorregulação para camarões palemonídeos (McNamara e Faria, 2012). Na absorção de NaCl duas forças motrizes são imprescindíveis, a primeira é a $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, localizada nas invaginações da membrana plasmática das células do septo (McNamara e Torres, 1999; Belli et al., 2009) e a segunda é a $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$, localizada nas membranas apicais das franjas das células pilares (Faleiros et al., 2010).

Painel 5 - Representação da câmara branquial de *Macrobrachium olfersii*.



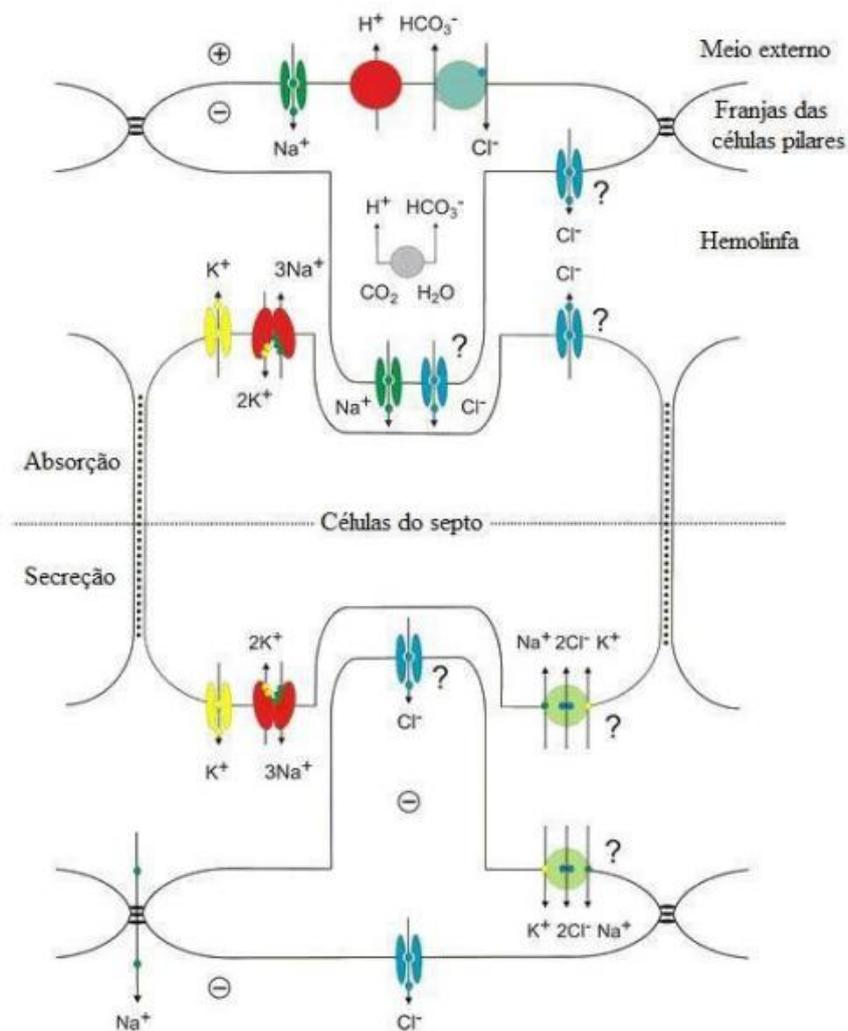
Fonte: Faleiros et al., 2010

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

A $V(H^+)$ -ATPase catalisa a extrusão de H^+ contra o gradiente eletroquímico hiperpolarizando a célula. Esse potencial de membrana promove a passagem de Na^+ do meio externo para o citosol das células pilares através de canais de Na^+ (Onken e Riestenpatt, 1998; Ituarte et al., 2016). Os canais de Na^+ transferem este íon para a célula do septo, já que o Na^+ presente nesta célula é transportado ativamente pela (Na^+, K^+) -ATPase para a hemolinfa (Onken e Riestenpatt, 1998; McNamara e Faria, 2012). O transporte de Cl^- utiliza o antiporte Cl^-/HCO_3^- apical na célula pilar (Torres, 2006) e passam diretamente para a hemolinfa através de canais de Cl^- localizados na membrana inferior das células pilares ou através de canais de Cl^- basais passando pelas células do septo e depois para a hemolinfa, acompanhando o Na^+ . Os íons H^+ e HCO_3^- são produzidos na célula pilar pela anidrase carbônica (Freire et al., 2008; McNamara e Faria, 2012).

Expostos a altas salinidade a secreção de Na^+ e Cl^- se faz necessária para a regulação osmótica em camarões palemonídeos (Péqueux, 1995; McNamara e Faria, 2012). O Na^+ e o Cl^- da hemolinfa são transportados pelo simporte $Na^+/K^+/Cl^-$ presente na membrana basal, favorecidos pelo gradiente de Na^+ gerado pela (Na^+, K^+) -ATPase, que leva os íons Na^+ de volta para a hemolinfa e os íons K^+ sendo reciclados por canais de K^+ na membrana basolateral (Luquet et al., 2005; McNamara e Faria, 2012). Estes canais sustentam o potencial negativo da célula permitindo o transporte do Cl^- através de canais basais de Cl^- através das células pilares até finalmente serem secretados para o meio externo através de canais apicais de Cl^- (McNamara e Faria, 2012). O efluxo de Cl^- cria um potencial elétrico negativo no espaço subcuticular energizando o efluxo de Na^+ parecelular entre as franjas das células pilares (McNamara e Faria, 2012). Porém essa regulação não depende apenas da variação da expressão e da atividade das enzimas (Na^+, K^+) -ATPase e $V(H^+)$ -ATPase que parece ser espécie-específica (Belli et al., 2009; Faleiros 2010, 2017; Ituarte et al., 2016; Freire et al., 2018; Huang et al., 2019), envolvendo também a expressão de diferentes isoformas, regulação por fosforilação ou o envolvimento de outras enzimas e transportadores (Leone et al., 2014; Maraschi et al., 2015; Lucena et al., 2017b).

Painel 6 - Modelo de hiper/hiposmorregulação em camarões palemonídeos.



Fonte: McNamara e Faria, 2012.

1.5 TOXICIDADE POR AMÔNIA

No ambiente aquático a amônia existe em um equilíbrio entre a forma ionizada, também chamada de íon amônio (NH_4^+) e a forma não-ionizada, simplificada por amônia (NH_3), respectivamente. A somatória das diferentes formas ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$) é chamada de amônia total ou simplesmente amônia.

A toxicidade por amônia tem sido atribuída em maior escala a concentração de amônia não-ionizada (Campus et al., 2012; De Lourdes Cobo et al., 2014), sendo a proporção relativa de NH_3 em relação a amônia total aumentada em baixas salinidades, alto pH e altas temperaturas da água (Miron et al., 2008; Lu et al., 2017; Valencia-Castañeda et al., 2018; Barbieri and Bondioli, 2015; Kir et al., 2004).

A equação de equilíbrio da amônia em solução aquosa pode ser simplificada por:



E a fração de amônia não-ionizada para água doce pode ser calculada de acordo com EMERSON et al. (1975).

A toxicidade da amônia pode causar anormalidades comportamentais como hiperscitabilidade e está associada à hiperplasia e hipertrofia do tecido branquial (Daoust e Ferguson, 1984).

A resposta imune inata em crustáceos está relacionada ao tempo de coagulação da hemolinfa, atividade fagocítica e depuração. A coagulação nos crustáceos se dá pela polimerização da proteína de coagulação (CP) pela ação da enzima transglutaminase de hemócitos (TG). Alteração no número de hemócitos circulantes foi observada em crustáceos após estresse (Perazzolo et al., 2005; Jussila et al., 2001; Chang et al., 2013; Bautista-Covarrubias et al., 2014; Romano e Zeng, 2013). A exposição de crustáceos à amônia prolonga o tempo de coagulação devido a diminuição da atividade TG e células hialinas (Chang et al., 2015). A diminuição na contagem total de hemócitos, diminuição da atividade fagocítica, diminuição da expressão de citocromo P450 1A, diminuição dos fatores imunes humorais, como crustina, fator anti-lipopolissacarídeo e lisozima e diminuição da atividades antibacteriana e bacteriolítica, enfraquecem as respostas fisiológicas e imunológicas tornando as espécies mais susceptíveis à patógenos como *Vibrio penaeicida*, *Vibrio alginolyticus*, *Enterococcus*, *Lactococcus garvieae* e o vírus da síndrome da mancha branca (Cerenius et al. 2010; Liu e Chen, 2004; Maningas et al., 2008; Yue et al., 2010, Liang et al., 2019).

A exposição de crustáceos a níveis subletais de amônia causam várias alterações morfológicas e fisiológicas nas brânquias, incluindo espessamento, descamação do epitélio, constrição ou colapso de lamelas, ruptura ou destruição de células pilares, necrose e infiltrações de hemócitos (de Freitas Rebelo et al., 2000; Romano e Zeng, 2007, 2010; Cheng et al., 2019), esses danos na membrana branquial podem dificultar as trocas gasosas (de Freitas Rebelo et al., 2000).

A exposição a níveis elevados de amônia leva à diminuição da oxi-hemocianina em vários crustáceos, incluindo *Penaeus monodon* (Chen e Cheng, 1993), *Penaeus japonicus* (Chen et al., 1994) e *Litopenaeus vannamei* (Racotta e Hernandez-Herrera, 2000). Essas evidências apontam para uma interrupção nas trocas gasosas induzidas por

amônia, que seria a possível causa dos níveis elevados de lactato relatados para *Eriocheir sinensis* exposto a amônia (Hong et al., 2007).

Amônia também pode causar estresse oxidativo nos organismos aquáticos, por meio do aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Duan et al., 2018). Para garantir que o nível de ROS permaneça dentro de uma faixa segura, os organismos são equipados com sistemas de defesa antioxidante, como substâncias antioxidantes endógenas e sistemas enzimáticos para eliminar ROS (Duru et al., 2014). A superprodução de ROS pode danificar biomoléculas, como DNA, proteínas e lipídios. A aclimação de crustáceos à elevadas concentrações de amônia aumenta a expressão das enzimas superóxido desmutase (SOD), glutathione S-transferase e Catalase (Ren e Pan, 2014; Wang et al., 2021) logo após a exposição, mas essa expressão parece diminuir com o tempo de exposição, destruindo o sistema de defesa antioxidante (Liu e Chen, 2004; Jia et al., 2014; Cheng et al., 2019).

Embora tradicionalmente a excreção de amônia em invertebrados aquáticos fosse considerada um processo estritamente passivo (Baldwin, 1947; Kormanik e Cameron, 1981), há agora um corpo de evidências para mostrar que o íon amônio é excretado ativamente, se necessário contra um gradiente de concentração em espécies que habitam águas salinas, salobras ou doce (Weihrauch et al., 1998, 1999, 2004; Weihrauch e O'Donnell, 2015).

A investigação sobre os mecanismos de excreção/transporte de amônia em sistemas invertebrados ainda é bastante escassa. Entretanto, estudos indicam que três proteínas são fundamentais para o transporte transcelular de amônia, sendo elas a (Na^+ , K^+)-ATPase, a $\text{V}(\text{H}^+)$ -ATPase e proteínas Rhesus (Rh) (Martin et al., 2011; Romano e Zeng, 2013; Liu et al., 2014; Weihrauch e O'Donnell, 2015; Pan et al., 2018; Zhao et al., 2020).

Em 1960 Jens Skou mostrou que a (Na^+ , K^+)-ATPase aceita NH_4^+ em substituição ao K^+ e, portanto, é capaz de bombear ativamente NH_4^+ dos fluidos corporais para células epiteliais transportadora de amônia (Skou, 1960). Posteriormente a participação desta enzima no transporte de íon amônio foi identificada nas brânquias de crustáceos (Weihrauch et al., 1998, 1999; Masui et al., 2002).

A manutenção de baixas concentrações de amônia na hemolinfa dos crustáceos em relação ao meio ambiente é mantida por três mecanismos principais, que incluem a excreção ativa de amônia, desintoxicação e alteração/sustentação de baixa permeabilidade branquial. Acredita-se que todos os três processos podem ser mobilizados

simultaneamente, embora o grau de contribuição de cada um na manutenção baixa de amônia seja específico para cada espécie (Martin et al., 2011; Romano e Zeng, 2013). Devido ao deslocamento de equilíbrio entre a forma ionizada e não ionizada da amônia o aumento do pH eleva a concentração de amônia na hemolinfa de *P. monodon*, provavelmente devido ao aumento da forma não ionizada, mais permeável, que se difunde passivamente através da membrana branquial e da hemolinfa (Chen e Kou, 1993). Em menor proporção a salinidade também modifica a concentração de amônia na hemolinfa de crustáceos, pois a amônia não ionizada é menos solúvel com o aumento de salinidade (Romano e Zeng, 2010).

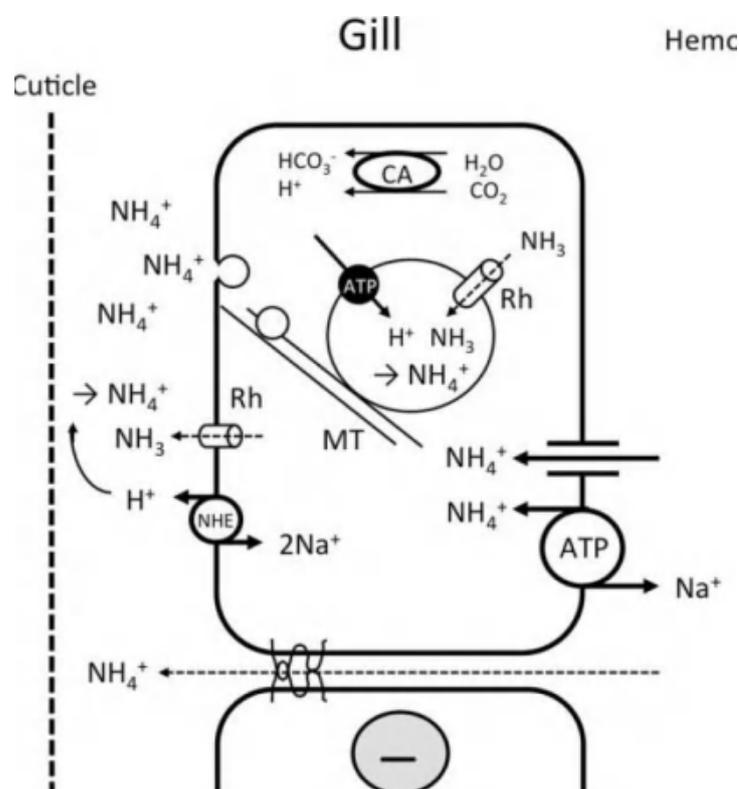
A maioria dos crustáceos decápodos é bentônica e/ou exibem o comportamento de soterramento, o que aumenta a probabilidade de encontrar níveis elevados de amônia no ambiente, já que a concentração de amônia em sedimentos é maior que na água (Weihrauch et al., 2004). Por esse motivo muitos crustáceos estão bem adaptados à elevadas exposições à amônia, desenvolvendo um mecanismo de excreção ativa de amônia contra um gradiente interno, prevenindo o acúmulo excessivo de amônia na hemolinfa, mitigando seus efeitos tóxicos (Weihrauch et al., 2004).

O mecanismo de excreção de amônia, baseado em *C. maenas* (Painel 7) sugere que a NH_3 , importada da hemolinfa ou produzida pelo metabolismo celular das brânquias, se difunde para vesículas acidificadas ($\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$) e é aprisionada neste compartimento como NH_4^+ (Weihrauch et al., 2002). As vesículas carregadas de NH_4^+ são transportadas em direção à membrana apical por uma rede de microtúbulos, onde NH_4^+ é excretado ao espaço subcuticular via exocitose (Weihrauch et al., 2002). A participação de microtúbulos na excreção de amônio foi confirmada em *Portunus trituberculatus* expostos à alta concentração de amônia (Ren et al., 2015). A amônia ionizada (NH_4^+) é transportada da hemolinfa para o epitélio branquial por substituição ao K^+ nos canais de potássio (impulsionado pelo potencial negativo da célula) e pela (Na^+, K^+)-ATPase. Finalmente o NH_4^+ celular é transportado para o espaço subcuticular utilizando o transportador Na^+/H^+ (NH_4^+) apical, sensível à amiloride, desde que uma proteína Rh esteja colocalizada (Weihrauch e O'Donnell, 2015). O canal Na^+/H^+ (NH_4^+) foi comprovado participar da excreção de amônia, essa excreção diminuiu 75% quando amiloride foi aplicado no lado luminal de larvas de *Manduca sexta* (Blaesse et al., 2010). Além disso, um movimento paracelular de NH_4^+ através do epitélio branquial bastante permeável ajudaria o processo de excreção. Estruturas permeáveis a cátions sensíveis à amiloride na cutícula também podem estar envolvidos na difusão de NH_4^+ para o meio

externo. As proteínas Rh são responsáveis por mediar o transporte de NH_4^+ em leveduras, mamíferos e peixes (Marini et al., 2000; Nakada et al., 2010; Adlimoghaddam 2015) e para o caranguejo *Metacarcinus magister* (Martin et al., 2011). Quando *Portunus trituberculatus* foi exposto à amônia a expressão de mRNA da proteína Rh foi aumentada (Liu et al., 2014) sendo a proteína Rh apontada como a principal proteína a contribuir para a excreção de compostos nitrogenados neste animal (Pan et al., 2018). Estudos sugerem que a proteína Rh se localize nas vesículas acidificadas e na membrana apical (Weihrach et al., 2004; Weihrach e O'Donnell, 2015; Zhao et al., 2020).

O hormônio hiperglicêmico de crustáceos parece também regular a excreção de amônia em *Litopenaeus vannamei* por três padrões, a saber, canal iônico, proteína e exocitose como explicado a seguir. Os canais iônicos são regulados principalmente pelas vias de sinalização PKA, PKC e PKG; as proteínas são ativadas principalmente pela via de sinalização Wnt e a exocitose é induzida principalmente pela via de sinalização PKA (Zhang et al., 2020).

Painel 7 - Modelo para excreção branquial de *Carcinus maenas*.



Legenda: CA, anidrase carbônica; NHE, trocador Na^+/H^+ (subfamília CPA1); Rh, proteína Rh; MT, rede de microtúbulos.

Fonte: Weihrach e O'Donnell, 2015.

2 OBJETIVOS

2.2 OBJETIVO GERAL

Investigar a toxicidade por amônia de *Macrobrachium amazonicum* capturado do Rio Grande. Determinando a concentração letal média e caracterizando e comparando as propriedades cinéticas da (Na⁺,K⁺)-ATPase do tecido branquial do animal recém-capturado ou aclimatado a uma concentração segura de amônia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a concentração letal média (LC_{50-96h}) para amônia de *M. amazonicum* adulto proveniente do Rio Grande, comparando com outras populações. Obter fração microsomal da brânquia de *M. amazonicum* adulto recém-capturado do Rio Grande. Aclimatar por 10 dias *M. amazonicum* adulto em amônia (0,1 x LC_{50-96h}). Obter fração microsomal da brânquia de *M. amazonicum* adulto aclimatado em amônia. Caracterizar a (Na⁺,K⁺)-ATPase branquial do animal recém-capturado e aclimatado em amônia. Determinar o padrão proteico (SDS-PAGE) das proteínas de membrana das brânquias de *M. amazonicum* recém-capturados e aclimatados a amônia. Determinar as ATPases presentes na fração microsomal da brânquia de *M. amazonicum* recém-capturado e aclimatado a amônia.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 MATERIAIS

ATP (sal de Tris), ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanol sulfônico (Hepes), imidazol, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ditioneitol (DTT), ouabaína, tapsigargina, aurovertina B, bafilomicina A1, alameticina, ácido etacrínico, fosfoenolpiruvato (FEP), NAD^+ , NADH, piruvato quinase (PQ), lactato desidrogenase (LDH), fosfoglicerato quinase (FGQ), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAFDH), 3-fosfogliceraldeído dietil acetal e padrão de peso molecular para eletroforese (30-200 KDa) foram adquiridos da Sigma. Etilenodiamino tetracético (EDTA) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Merck. O coquetel de inibidores de protease (leupeptina 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, antipainá 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, benzamidina 1 mmol L^{-1} e pepstatina A 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi adquirido da Calbiochem. O anticorpo monoclonal $\alpha 5$ contra a subunidade α da (Na,K)-ATPase de aves (todas as isoformas) foi adquirido do Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa, USA). O anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase foi adquirido da Sigma Chem. Co., (USA). A resina AG50WX-8 foi adquirida da Biorad (USA). Cloreto de amônio, hipoclorito de sódio, fenol, nitroprussiato de sódio e citrato de sódio foi adquirido da Synth e o anti-cloro (Tiosulfato de sódio e Carbonato de sódio) foi adquirido da Tropical. Os demais reagentes utilizados nesse trabalho são de grau analítico e as soluções foram preparadas usando água tratada por ultrapurificação.

Antes do uso, as soluções de enzimas LDH e PQ, comercializadas em suspensões cristalinas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,2 mol L^{-1} foram tratadas para a remoção do íon amônio. Uma alíquota de 500 μL da enzima (PQ ou LDH) foi centrifugada a 20.000 $\times g$ durante 15 min, a 4°C, em uma centrífuga refrigerada Eppendorf 5810. O pellet obtido foi ressuspense em 500 μL de Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5 e após foi transferido para um filtro Microcon YM-10, foi lavado 5 vezes com o mesmo tampão por centrifugação a 14.000 $\times g$, durante 10 min, a 4°C, para completar a remoção total dos íons amônio (testada com reagente de Nessler). Finalmente, foi adicionado tampão Hepes 50 mmol L^{-1} pH 7,5 até completar o volume inicialmente utilizado. Para a enzima FGQ a suspensão foi tratada exatamente como descrito acima. Todas as soluções foram usadas dentro de um período máximo de três dias. Enquanto que a GAFDH foi preparada em tampão Hepes 50 mmol L^{-1} , pH 7,5, contendo DTT 1 mmol L^{-1} logo antes do seu uso.

O coquetel de inibidores de protease utilizado nas preparações da fração microsomal contém leupeptina $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, antipaína $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, benzamidina 1 mmol L^{-1} , pepstatina A $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e PSMF $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. A solução estoque dos inibidores foi preparada 100 vezes mais concentrada sendo diluída no tampão de homogeneização no momento do uso na concentração final indicada. As massas de pepstatina e o PSMF foram inicialmente dissolvidos em $500 \mu\text{L}$ de metanol e etanol, respectivamente e os demais inibidores em água. Finalmente a solução estoque foi completada até um volume de 10 mL de água ultrapura.

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

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

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

3.2 COLETA DE ANIMAIS E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO

Machos e fêmeas adultos de *M. amazonicum* de aproximadamente 7 cm de comprimento foram capturados usando armadilhas na vegetação das margens do reservatório da Usina de Água Vermelha no Rio Grande, próximo à cidade de Iturama, Minas Gerais, Brasil ($19^\circ 47' \text{ S}$, $50^\circ 05' \text{ W}$). Os camarões foram coletados utilizando a permissão ICMBio/MMA #72032-1 para DPG. Os animais foram transportados para o Laboratório de Química da Universidade Federal do Triângulo Mineiro Campus Iturama

em caixas de transportes contendo 30 L de água aerada do local de coleta (salinity <0.5‰, ≈ 23 °C).

Os camarões foram mantidos na água do rio por 24 h antes do uso em experimentos para estabelecer a concentração letal de amônia de 96 h (CL_{50-96 h}) e nos estudos cinéticos em camarões aclimatados à amônia. Os camarões para os estudos cinéticos sem amônia foram usados imediatamente após repousar no laboratório por 1 h (camarões recém-capturados).

3.3 DETERMINAÇÃO DA LC_{50-96H}

A metodologia utilizada para avaliar a concentração letal média (LC_{50-96h}) fundamentou-se no manual da Environmental Protection Agency USA (Peltier; Weber, 1985). Durante todos os experimentos um aquário foi utilizado como controle (sem adição de cloreto de amônio), garantindo que os animais não morreriam por fatores adversos. As experiências utilizaram 480 camarões adultos coletados no Rio Grande, divididos aleatoriamente em 48 unidades experimentais. As unidades consistiam de um aquário com um volume de 20 litros de água de poço para cada 10 animais adultos ($3,56 \pm 1,71$ g, $5,15 \pm 0,90$ cm). As unidades experimentais foram equipadas com sistemas de aeração e fotoperíodo natural de 12/12 horas (luz/escurecimento). O design foi completamente randomizado, com seis concentrações diferentes de amônia total (10,09; 20,19; 48,38; 57,20; 67,30; 84,12; 100,9 mg L⁻¹) e seis réplicas para cada concentração de amônia total. Os níveis de amônia resultaram da adição de volumes adequados da solução mãe de NH₄Cl (solução mãe de 1000 mg L⁻¹ NH₄Cl) para produzir as concentrações de amônia total final desejadas. As concentrações empregadas foram indicadas por testes preliminares. Os camarões foram observados a cada 1 hora durante as primeiras 8 horas. Entre 8 horas e 96 horas, as observações foram realizadas a cada 8 horas. Após o final do experimento os sobreviventes eram descartados e os aquários lavados com água. A mortalidade observada para o *M. amazonicum* controle (não exposto a amônia) durante o período experimental pode estar relacionado ao comportamento agonístico dos animais em competição por área (territorialismo). Para determinar a morte do animal foi adotado o critério de ausência total de qualquer tipo de movimento ou reação a estímulos mecânicos usando haste de vidro. Nas primeiras 8 horas os camarões foram observados

de hora em hora. Entre 8 horas e 96 horas, as observações foram realizadas a cada 8 horas (Armstrong et al., 1976).

Durante o período experimental, a temperatura da água variou de 24,2 a 28,4 °C, oxigênio dissolvido de 5,2 a 6,1 mg L⁻¹, pH de 7,6 a 8,0, alcalinidade de 20,1 a 26,5 mg L⁻¹ CaCO₃ e dureza de 25,1 a 48,4 mg L⁻¹.

3.4 ANÁLISES DE QUALIDADE DA ÁGUA

Foram avaliadas diariamente as seguintes variáveis de qualidade da água: oxigênio dissolvido (Oxímetros, Hanna HI 9146), temperatura (termômetro digital) e pH (Phmeter, Even PHS-3E). No início e novamente no final da experiência, amônia total, alcalinidade e dureza também foram determinados (Apha, 2005). A fração de amônia não-ionizada foi calculada de acordo com Emerson et al. (1975).

3.5 DOSAGEM DE AMÔNIA

Em solução aquosa de amônia, há equilíbrio entre as espécies ionizadas e não ionizadas, porém a toxicidade para os organismos aquáticos tem sido atribuída principalmente à amônia não ionizada (Campbell, 1973; Frías-Espericueta et al., 2000).

A determinação da amônia total foi realizada de acordo com Solorzano, 1969. O princípio da técnica consiste na formação do indofenol, um composto de cor intensamente azul, formado pela reação da amônia, hipoclorito e fenol, catalisado pelo nitroprussiato de sódio. Citrato foi usado para eliminar a interferência produzida pela precipitação dos íons magnésio e cálcio em pH alto (Zhou e Boyd 2016). A absorvância do composto foi dosada em 640nm em espectrofotômetro Hitachi U 1800. As concentrações das amostras foram determinadas comparando as absorvâncias a curva padrão com concentrações conhecidas de cloreto de amônio.

A concentração de amônia não ionizada é dependente da concentração de amônia total, pH, temperatura e força iônica. A forma não ionizada aumenta com o aumento do pH e da temperatura e diminui com a força iônica, mas é desprezível em sistemas naturais de água doce (Emerson et al., 1975). A fração de amônia não ionizada foi calculada de acordo com a equação 1, em quem NH₃= amônia não-ionizada, NH₃ + NH₄⁺= amônia total, pKa = - log Ka, calculado como $pKa = 0,09018 + 2729,92 / T$ e T = temperatura em ° Kelvin (Emerson et al., 1975).

$$NH_3 = \left[\frac{NH_3 + NH_4^+}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \right] \quad (2)$$

3.6 PREPARAÇÃO MICROSOMAL

Os homogenizados foram preparados no mesmo dia da coleta (recém-capturado) ou após 10 dias aclimatados a 4,9 mg L⁻¹ de amônia total. Uma coleção de 80 espécimes foi separada em quatro grupos de 20 camarões e cada grupo mantido em tanques contendo 32L de água aerada, a 25 °C, com fotoperíodo natural de 12h.

Para cada preparação foram utilizados aproximadamente 80 camarões. Os animais foram anestesiados em gelo picado e as brânquias foram imediatamente removidas e transferidas para tampão de homogeneização (tampão imidazol 20 mmol L⁻¹, pH 6,8, contendo sacarose 250 mmol L⁻¹, Tris 6 mmol L⁻¹ e o coquetel de inibidores de proteases) mantido a 4° C. As brânquias foram pesadas após remover o excesso de tampão com papel filtro Whatman e em seguida homogeneizadas no tampão de homogeneização (20 mL/g brânquia) utilizando um homogeneizador Potter, ajustado para 1.200 rpm.

O homogeneizado obtido foi submetido a centrifugação de 14.000 ×g, durante 35 min, a 4° C, em uma centrífuga Sorvall RC5C Plus. O sobrenadante foi mantido em banho de gelo picado e o pellet resultante foi novamente homogeneizado no mesmo volume inicial do tampão de homogeneização. Esse novo homogeneizado foi submetido à nova centrifugação nas mesmas condições. Os sobrenadantes resultante das duas centrifugações foram gentilmente misturados e submetidos a uma nova centrifugação a 100.000 ×g durante 90 min, a 4° C em uma ultracentrífuga Hitachi 55P-72. Finalmente, o *pellet* resultante (fração microsomal) foi ressuspensão em tampão de homogeneização (13 mL/g de brânquia) e alíquotas de 0,5 mL foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20 °C por um período não superior a 3 meses. Quando necessário os tubos foram descongelados e mantidos em gelo picado durante um período de até 4 h.

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNA

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

3.8 ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

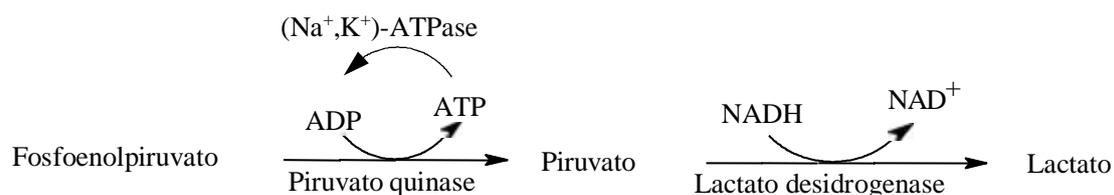
A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em gradiente de poliacrilamida (5 a 20%, p/v) utilizando 4µg de proteína, conforme descrito por Laemmli (1970). Após a corrida, o gel foi corado com nitrato de prata. Para determinação da escala de peso molecular foi utilizado 10 µL do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

3.9 WESTERN BLOTTING

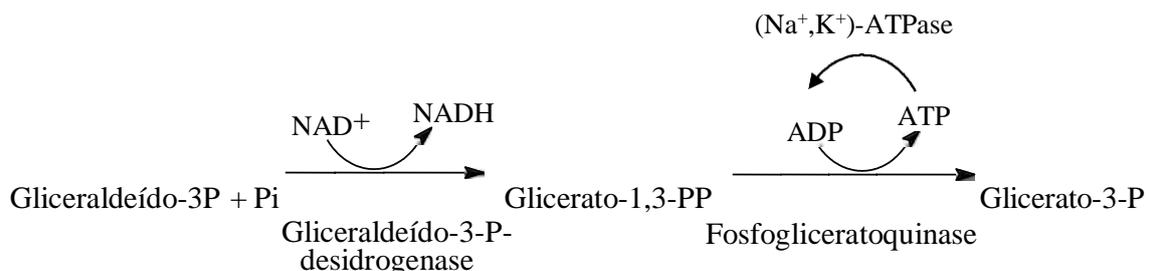
Foi realizada a eletroforese (SDS-PAGE) utilizando 70 µg, após a corrida o gel foi submetido a uma eletrotransferência para uma membrana de PVDF previamente incubada com 100% de metanol, com a aplicação de uma corrente de 300 mA com voltagem livre durante 90 minutos, a 4 °C utilizando o sistema Gibco BRL Mini-V 8-10 (Gaithersburg, USA) de acordo com Towbin et al. (1979). A membrana foi bloqueada com uma solução de leite desnatado em 5% em tampão TBS-Tween (Tris/HCl 50 mmol L⁻¹, pH 8,0, contendo NaCl 150 mmol L⁻¹ e Tween-20 0,05%), durante 60 minutos, sob agitação constante e temperatura ambiente. Após este período, a membrana foi lavada cinco vezes com tampão TBS-Tween e a seguir foi encubada durante 16 horas, a 5 °C, com o anticorpo α-5 monoclonal de camundongo, produzido contra a subunidade alfa da (Na⁺, K⁺)-ATPase de galinha (diluição 1:150 em uma solução desoroalbumina bovina 0,1% em tampão Tris/HCl 50 mmol L⁻¹, pH 8,0, contendo NaCl 150 mmol L⁻¹). Após cinco lavagens em tampão TBS-Tween a membrana foi incubada durante 2 hora, a 25 °C, com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase (diluído 1:1000 na mesma solução que o anticorpo primário). Finalmente, a incorporação específica de anticorpo foi revelada com Sigma Fast DAB with Metal Enhancer. Para a determinação da Mr da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi utilizado 25 µL do padrão de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, EUA).

3.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ DA FRAÇÃO MICROSOMAL

A atividade ATPase total foi determinada continuamente, a 25 °C empregando-se o sistema de acoplamento piruvato quinase/lactato desidrogenase, no qual a hidrólise de ATP é acoplada à oxidação do NADH (Leone et al., 2015). A oxidação do NADH foi estimada em 340 nm ($\epsilon_{340 \text{ nm}, \text{pH } 7,5} = 6.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 equipado com células termostatizadas.



Para o estudo do efeito do potássio e amônio, a atividade ATPase foi quantificada empregando-se o sistema de acoplamento gliceraldeído — 3 — fosfato desidrogenase fosfogliceratoquinase, onde a hidrólise do ATP é acoplada à redução do NAD^+ (Leone et al., 2015). A redução do NAD^+ foi estimada em 340 nm ($\epsilon_{340 \text{ nm}, \text{pH } 7,5} = 6.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 equipado com células termostatizadas.

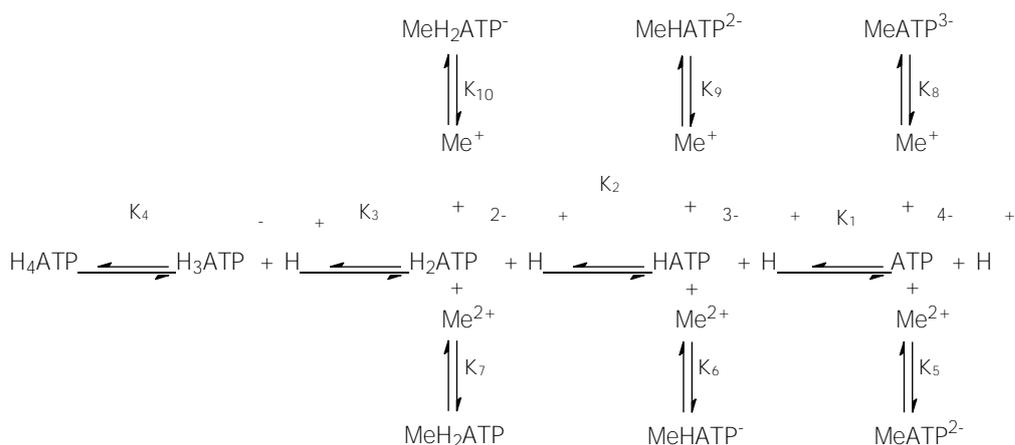


A atividade ATPase também foi determinada na presença de ouabaína 3 mmol L^{-1} . A diferença entre a medida efetuada na ausência e presença da ouabaína foi considerada como correspondente à atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal de *M. amazonicum*. A hidrólise do ATP também foi estimada após a incubação da amostra com $10 \mu\text{g}$ de alameticina durante 10 min, a 25 °C, para verificar a presença de vesículas seladas no meio de reação. Controles sem a adição da enzima foram incluídos nos experimentos para estimar a hidrólise espontânea do substrato nas condições do ensaio. A linearidade das medidas da atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi checada entre 10 e $50 \mu\text{g}$

proteína total e a quantidade de proteína microsomal sempre foi usada dentro desse intervalo. Para cada concentração de ligante analisado (ATP, Na⁺, K⁺, Mg²⁺ e o inibidor ouabaína) a velocidade inicial da reação foi estimada em duplicata utilizando alíquotas idênticas da mesma preparação e a média desses valores foi usada para ajustar a curva de saturação correspondente. Os ensaios foram realizados em duplicata e cada experimento foi repetido empregando-se três preparações diferentes (N= 3). Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 nmol de ATP por minuto, a 25 °C nas condições padrões do ensaio e a atividade específica é dada em nmol de Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína ou U mg⁻¹.

3.11 CÁLCULO DE ESPÉCIES LIVRES NO MEIO DE REAÇÃO

A concentração das espécies livres de Mg²⁺, ATP e MgATP no meio de reação foram calculados de acordo com Fabiato (1988), de acordo com o seguinte equilíbrio:



in which $\text{pK}_1= 6.53$, $\text{pK}_2= 4.06$, $\text{pK}_3= 1.00$, $\text{pK}_4= 1.00$, $\text{pK}_5= 4.22$, $\text{pK}_6= 2.24$, $\text{pK}_7= 1.58$ and $\text{Me}=\text{Mg}^{2+}$.

3.12 TRATAMENTO DOS DADOS CINÉTICOS

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

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A concentração média letal (LC_{50-96h}) de amônia foi calculada pelo método probit (Finney, 1971), utilizando o programa GraphPad Prism 7. Esse método estabelece a relação entre os “probits” da mortalidade cumulativa observada e o logaritmo das concentrações de amônia. A relação entre a concentração de amônia e a mortalidade foi então submetida a análise de regressão logística.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. DETERMINAÇÃO DA LC_{50-96h}

A concentração de amônia total em cada aquário não variou no decorrer do experimento. Os testes foram iniciados com uma concentração de 30 mg L⁻¹ de cloreto de amônio (ou 10,09 mg L⁻¹ amônia total), esse valor é um pouco inferior a LC_{50-96h} determinada por Dutra et al. (2016). Observou-se que concentrações de cloreto de amônio de até 30 mg L⁻¹ não provocavam mortalidade dos animais. Concentrações maiores foram testadas, a adição de 350 mg L⁻¹ de cloreto de amônio (ou 117,69 mg L⁻¹ de amônia total) provocou a mortalidade de 100% após 48h, enquanto concentrações de 300 mg L⁻¹ de cloreto de amônio (ou 100,9 mg L⁻¹ de amônia total) provocou a mortalidade de 99,67% em 96h. A Tabela 1 detalha os resultados dos experimentos.

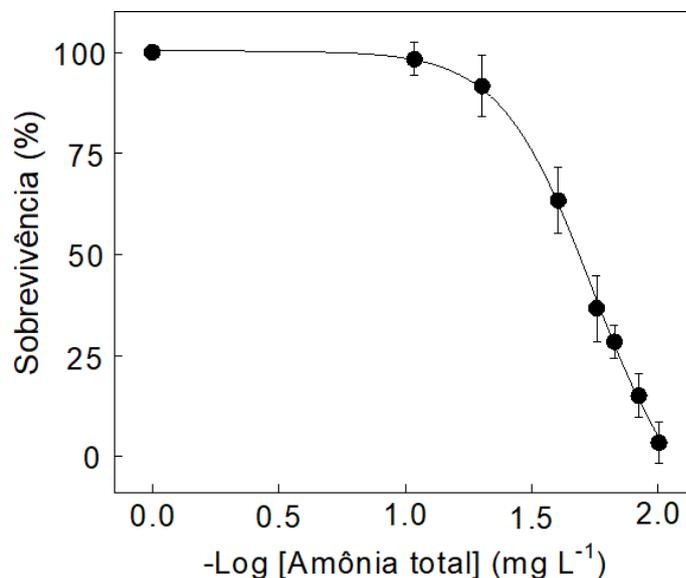
A análise probit para os dados apresentados na tabela abaixo foi realizada plotando a porcentagem de sobrevivência X logaritmo da concentração de amônia total (Figura 1). O perfil de probabilidade para os dados calculados pelo programa GraphPad Prism versão 7 varia de 46,49 até 51,91 mg L⁻¹, com um valor de $r^2 = 0,9461$. A concentração de amônia total responsável pela morte de 50% dos espécimes (LC_{50-96h}) equivale a 49,27 mg L⁻¹ de amônia total ou 2,3 mg L⁻¹ para NH₃. Os níveis seguros de exposição à amônia para o adulto *M. amazonicum* seriam, assim, 4,927 mg L⁻¹ para amônia total e 0,23 mg L⁻¹ para NH₃.

Tabela 1 - Mortalidade de *Macrobrachium amazonicum* expostos à diferentes concentrações de cloreto de amônio.

	Concentração de amônia total (mg L⁻¹)							
	Controle	10,09	20,19	40,37	57,19	67,29	84,11	100,93
Sobreviventes	10	10	10	6	3	3	1	0
Experimento 1								
Sobreviventes	10	9	9	5	4	3	2	0
Experimento 2								
Sobreviventes	10	10	10	7	5	3	2	1
Experimento 3								
Sobreviventes	10	10	9	6	3	3	2	0
Experimento 4								
Sobreviventes	10	10	8	7	3	3	1	0
Experimento 5								
Sobreviventes	10	10	9	7	4	2	1	1
Experimento 6								
Média de	10	9,83	9,17	6,33	3,66	2,83	1,5	0,33
Sobreviventes								
Porcentagem	100	98,3	91,7	63,3	36,6	28,3	15,0	3,3
sobreviventes								
N° probit		7,1272	6,3852	5,338	4,655	4,4260	3,9636	3,1616

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Figura 1 - Regressão logística da LC₅₀ para adultos de *M. amazonicum* depois de 96h expostos a amônia total.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

M. amazonicum adultos (n= 10) foram colocados em 20L de água aerada com diferentes concentrações de amônia total (10,09; 20,19; 40,37; 57,19; 67, 28; 84,11 e 100,93 mg L⁻¹). Os indivíduos foram monitorados e retirados assim que morriam, após 96h foi calculado a taxa de sobrevivência. O experimento foi realizado em sextuplicata (n= 6).

4.2 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA (Na⁺, K⁺)-ATPase

A atividade ATPase da fração microsomal de *M. amazonicum* recém-capturado foi estimada na presença de 10µg de alameticina e revelou a presença de vesículas seladas contendo (Na⁺, K⁺)-ATPase. Para os camarões recém-capturados a atividade ATPase foi 35% maior na presença de alameticina, assim todas as análises cinéticas da atividade ATPase nesta condição foram estimadas na presença de 10 µg de alameticina. Entretanto a presença de alameticina no meio reacional não alterou a atividade ATPase para os animais expostos à amônia, indicando que nesta condição não existem vesículas seladas na preparação.

A preparação microsomal de *M. amazonicum* recém-capturado mostrou uma atividade ATPase máxima de $162,0 \pm 6,0$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ proteína. Em presença de 3 mmol L⁻¹ ouabaína a atividade diminui para $37,5 \pm 3,5$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ proteína, sugerindo que a (Na⁺, K⁺)-ATPase representa 77% de toda a atividade ATPase na preparação microsomal. Para *M. amazonicum* aclimatados à 4,9 mg L⁻¹ de amônia total a atividade ATPase total apresentada foi de $220,0 \pm 7,3$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína enquanto $55,0 \pm 1,5$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína corresponde à atividade ATPase insensível a ouabaína, assim a atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase corresponde a $165,0 \pm 6,1$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína ($\approx 75\%$ da atividade ATPase total). Os resultados sugerem que a fração microsomal contém outras enzimas com atividade de ATPase.

A estimulação da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase pelo ATP (como Mg•ATP), na presença de excesso de íons magnésio para *M. amazonicum* recém-capturado ou aclimatado a amônia está mostrada na Figura 2. Em condições saturantes de Mg²⁺ (2mmol L⁻¹ ou 0,5 mmol L⁻¹ para recém-capturado ou aclimatado à amônia, respectivamente), Na⁺ (50mmol L⁻¹ ou 15 mmol L⁻¹ para recém-capturado ou aclimatado à amônia, respectivamente) e K⁺ (10 mmol L⁻¹ em ambas as condições), a atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase foi estimulada através de uma curva monofásica no intervalo de concentração de ATP entre 10⁻⁶ e 10⁻³ mol L⁻¹. Nessas condições a atividade máxima foi estimada em $V_{M=}$ 137,3 \pm 8,1 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ proteína e $V_{M=}$ 170,5 \pm 6,5 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ proteína com $K_{M=}$ 0,083 \pm 0,010 mmol L⁻¹ e $K_{M=}$ 0,106 \pm 0,010 mmol L⁻¹ para o camarão recém-capturado (Fig. 2A) e aclimatado à amônia (Fig. 2B), respectivamente (Tabela 2). A atividade ATPase insensível à ouabaína de $37,5 \pm 3,5$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ proteína e $54,0 \pm 3,0$ nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ proteína sugerem a presença de outras ATPases diferentes da (Na⁺, K⁺)-ATPase na preparação microsomal de ambos os camarões, recém-capturados ou aclimatados à amônia, respectivamente (inserções das figuras 3A e B). Pode-se observar que sob concentrações fixas de Mg²⁺, a atividade ATPase aumenta com aumento da concentração de Mg•ATP e não com a concentração de ATP livre, sugerindo que Mg•ATP é o verdadeiro substrato da enzima de *M. amazonicum* recém-capturado (Fig. 2C) ou aclimatado à amônia (Fig. 2D).

A modulação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* recém-capturado ou aclimatado à amônia pelo Mg²⁺ (Figura 3A e B, respectivamente) foram determinadas em condições saturantes de ATP (1 mmol

L⁻¹ para ambas as condições), Na⁺ (50mmol L⁻¹ ou 15 mmol L⁻¹ para recém-capturado ou aclimatado à amônia, respectivamente) e K⁺ (10 mmol L⁻¹ para ambas as condições). No intervalo de concentração de MgCl₂ entre 10⁻⁵ e 10⁻³ mol L⁻¹, o aumento da concentração do Mg•ATP estimulou a atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase até valores máximos de V_M = 135,6 ± 2,5 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína e K_{0,5} = 0.16 ± 0.011 mmol L⁻¹ para os animais recém-capturados e V_M = 164,9 ± 5,2 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína e K_{0,5} = 0.178 ± 0.013 mmol L⁻¹, através de interações cooperativas (Tabela 2). O cálculo da concentração das espécies em solução confirma que a estimulação da atividade é devida ao Mg•ATP e não ao ATP livre (Fig. 3C e D). Nessas condições, a atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase representa cerca de 78 e 75% da atividade total e a atividade ATPase insensível à ouabaína foi estimulada até valores da ordem 37,5 e 55 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, para recém-capturado ou aclimatado à amônia, respectivamente (inserções das Figuras 3A e B) sugerindo a presença de outras ATPases estimuladas por magnésio nas preparações.

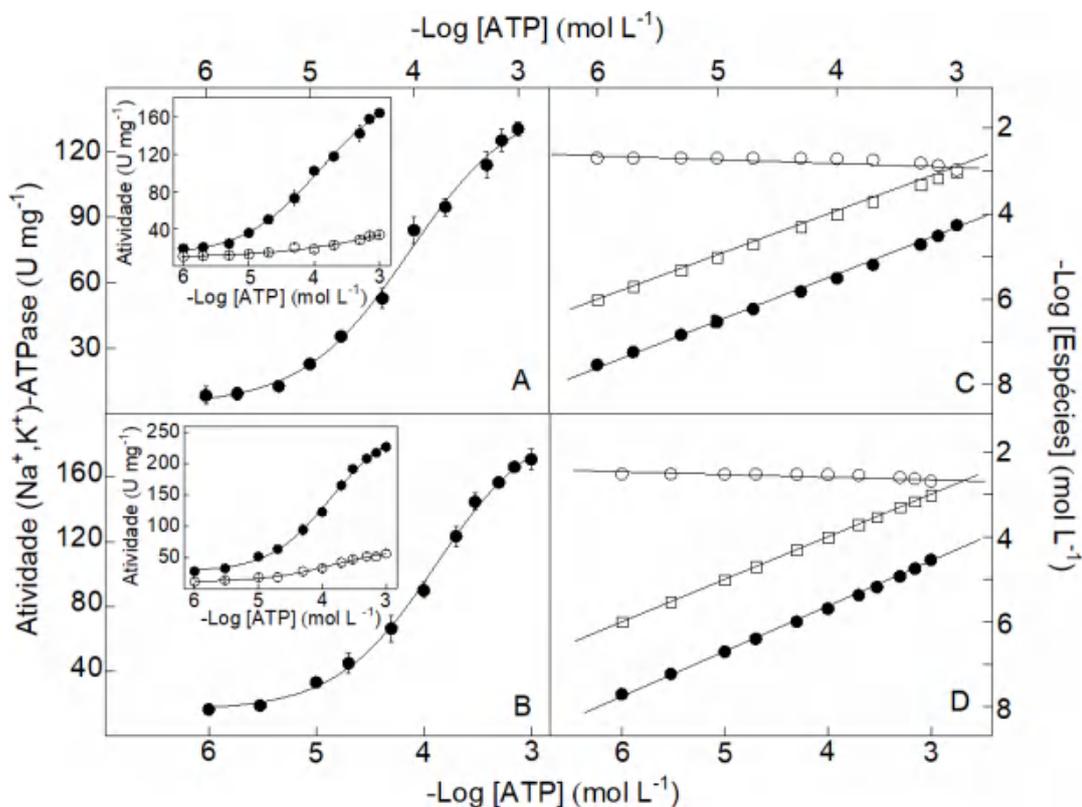
Na Figura 4 está mostrada a modulação pelo Na⁺ da atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* recém-capturado no Rio Grande (Fig. 4A) ou aclimatado em amônia (Fig. 4B). Na presença de concentrações saturantes de ATP, K⁺ e Mg²⁺, o aumento da concentração de íons sódio entre 5.10⁻⁴ e 5.10⁻² mol L⁻¹ estimulou a atividade (Na⁺, K⁺)-ATPase até valores máximos de V_M = 134,2 ± 4,3 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína e K_{0,5} = 5,5 ± 0,48 mmol L⁻¹ através de cinética cooperativa (n_H = 1,5) para os camarões recém-capturados ou V_M = 169,6 ± 4,9 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína e K_{0,5} = 4,9 ± 0,37 mmol L⁻¹ através de cinética cooperativa (n_H = 2,4) para camarões aclimatados à amônia (Tabela 2). A atividade ATPase insensível à ouabaína não foi estimulada nesse mesmo intervalo de concentração de íons sódio em ambas as condições (inserções da Figura 4).

A modulação da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* recém-capturado (Fig. 5A) ou aclimatado à amônia (Fig. 5B) pelo K⁺ foi determinada em condições saturantes de ATP (1 mmol L⁻¹, para ambas as condições), Na⁺ (50mmol L⁻¹ ou 15 mmol L⁻¹ para recém-capturado ou aclimatado à amônia, respectivamente) e Mg²⁺ (2mmol L⁻¹ ou 0,5 mmol L⁻¹ para recém-capturado ou aclimatado à amônia, respectivamente) no intervalo de 5.10⁻⁵ a 2.10⁻² mol L⁻¹. O aumento da concentração dos íons potássio estimulou a atividade da enzima até valores máximos de V_M = 32,3 ± 5,6 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína e K_{0,5} = 0.75 ± 0.14 mmol L⁻¹, através

de interações cooperativas ($n_H = 1,4$) para *M. amazonicum* recém-capturado ou $V_M = 168,2 \pm 5,3 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e $K_{0,5} = 0,97 \pm 0,12 \text{ mmol L}^{-1}$, através de interações cooperativas ($n_H = 1,6$) para aclimatado à amônia (Tabela 2). Neste mesmo intervalo de concentração, a estimulação da atividade ATPase insensível à ouabaína pelos íons potássio, não pode ser considerada desprezível, representando uma atividade de $33,0 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (15% da atividade ATPase total, inserção da Figura 5) para os camarões aclimatados à amônia, porém nenhuma estimulação foi observada para os camarões recém-capturados.

Íons amônio estimulam a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ em condições saturantes de ATP, Mg^{2+} e Na^+ e na ausência de K^+ (Fig. 6). O aumento da concentração de NH_4^+ (1×10^{-4} a $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) estimula a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ até valores máximos de $V_M = 149,2 \pm 7,1 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ e $V_M = 169,4 \pm 5,4 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ com $K_{0,5} = 2,5 \pm 0,27 \text{ mmol L}^{-1}$ e $K_{0,5} = 1,01 \pm 0,20 \text{ mmol L}^{-1}$, para camarão recém-capturado ou aclimatado à amônia, respectivamente. Uma cinética cooperativa foi observada em ambas as condições, recém-capturado (Fig. 6A) e aclimatado à amônia (Fig. 6B). Nenhuma estimulação foi observada para a atividade ATPase insensível à ouabaína na mesma variação de concentração de NH_4^+ (inserções das Figuras 6A e B).

Figura 2 - Efeito da concentração de ATP na atividade (Na^+ , K^+)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum* recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias.

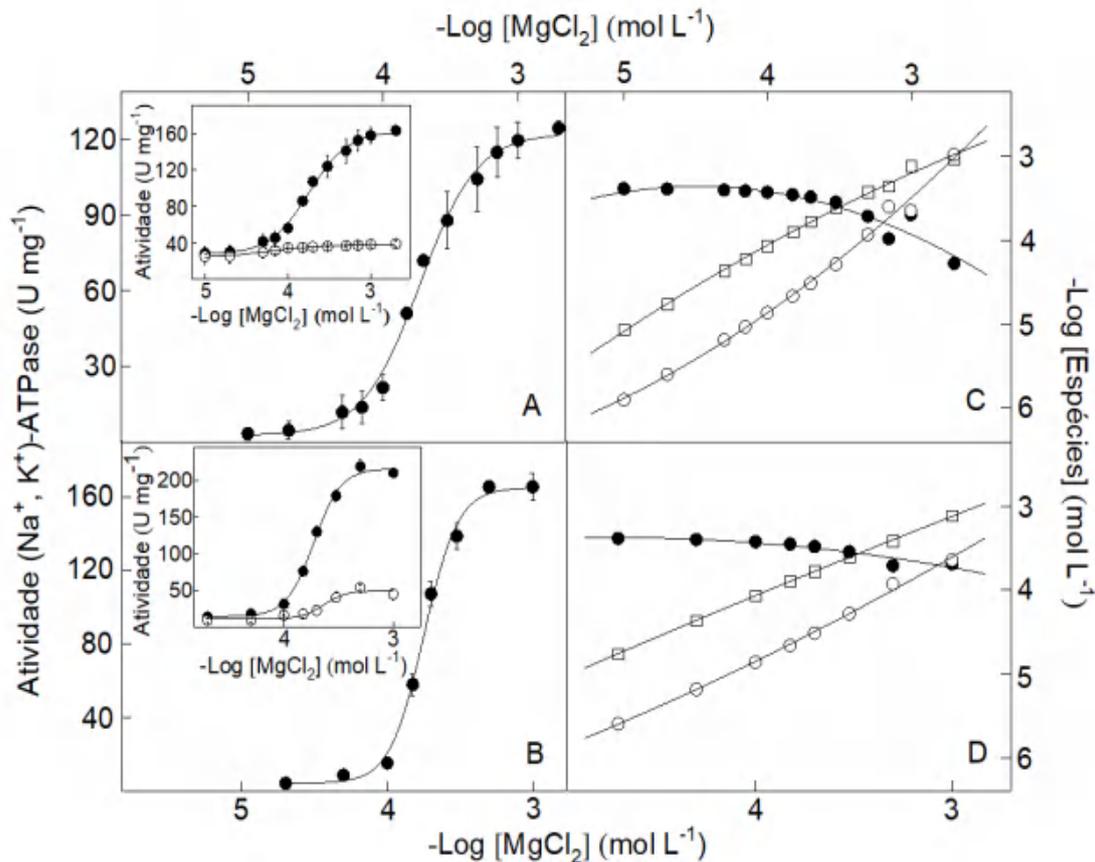


Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

A atividade (Na^+ , K^+)-ATPase de *M. amazonicum* recém-capturado no Rio Grande ou aclimatado à amônia não foi estimulado sinergisticamente na presença de K^+ e NH_4^+ .

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão HEPES 50 mmol L^{-1} , pH 7.5, contendo MgCl_2 2,0 mmol L^{-1} (ou 0,5 mmol L^{-1}), NaCl 50 mmol L^{-1} (ou 15 mmol L^{-1}), KCl 10 mmol L^{-1} (ambas as condições), NADH 0,21 mmol L^{-1} , FEP 3,18 mmol L^{-1} , 89 U PQ e 94 U LDH para recém-capturados (ou aclimatados à amônia). A reação foi iniciada pela adição de 12 μg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogêneos de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde aos valores médios (\pm SD). **A-** Recém-capturado. **B-** Aclimatado à amônia. **C-** e **D-** Concentrações calculadas de Mg^{2+} livre (□), ATP livre (●) e $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ (○) para recém-capturado e aclimatado à amônia, respectivamente. **Inserção:** A e B: atividade ATPase insensível à ouabaína (□); atividade ATPase total (●).

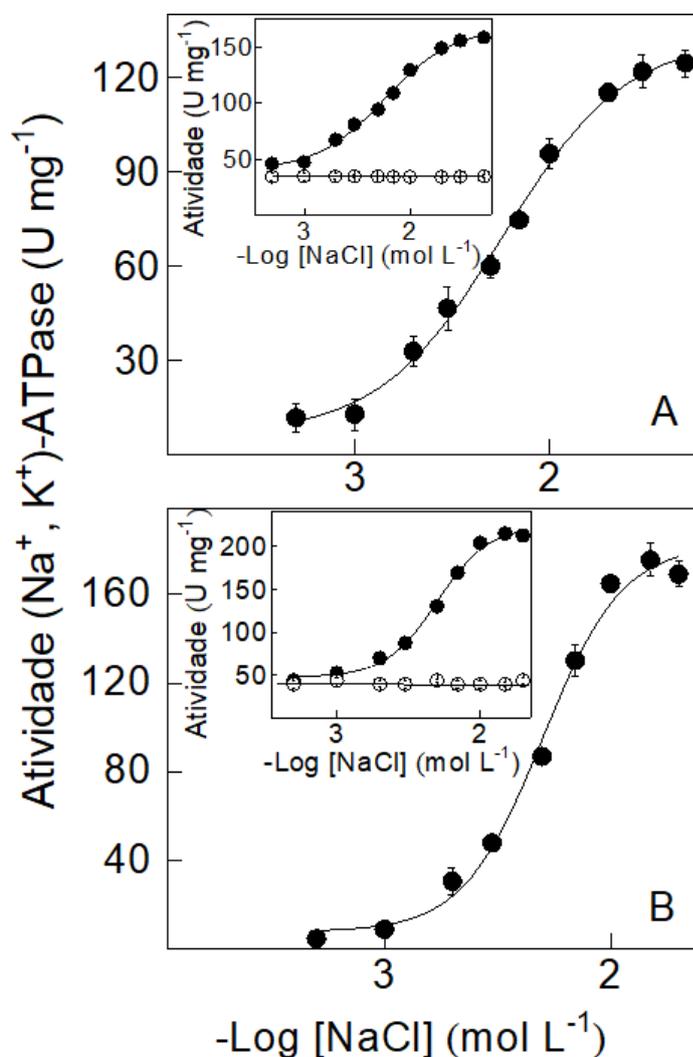
Figura 3 - Efeito da concentração de Mg^{2+} na atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum* recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7.5, contendo ATP 1,0 mmol L⁻¹ (ambas as condições), NaCl 50 mmol L⁻¹ (ou 15 mmol L⁻¹), KCl 10 mmol L⁻¹ (ambas as condições), NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,18 mmol L⁻¹, 89 U PQ e 94 U LDH para recém-capturados (ou aclimatados à amônia). A reação foi iniciada pela adição de 12 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios (± SD). **A**- Recém-capturado. **B**- Aclimatado à amônia. **C**- e **D**- Concentrações calculadas de Mg^{2+} livre (□), ATP livre (●) e $Mg \cdot ATP$ (○) para recém-capturado e aclimatado à amônia, respectivamente. **Inserção**: A e B: atividade ATPase insensível à ouabaína (□); atividade ATPase total (●).

Figura 4 - Efeito da concentração de Na^+ na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum* recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias.

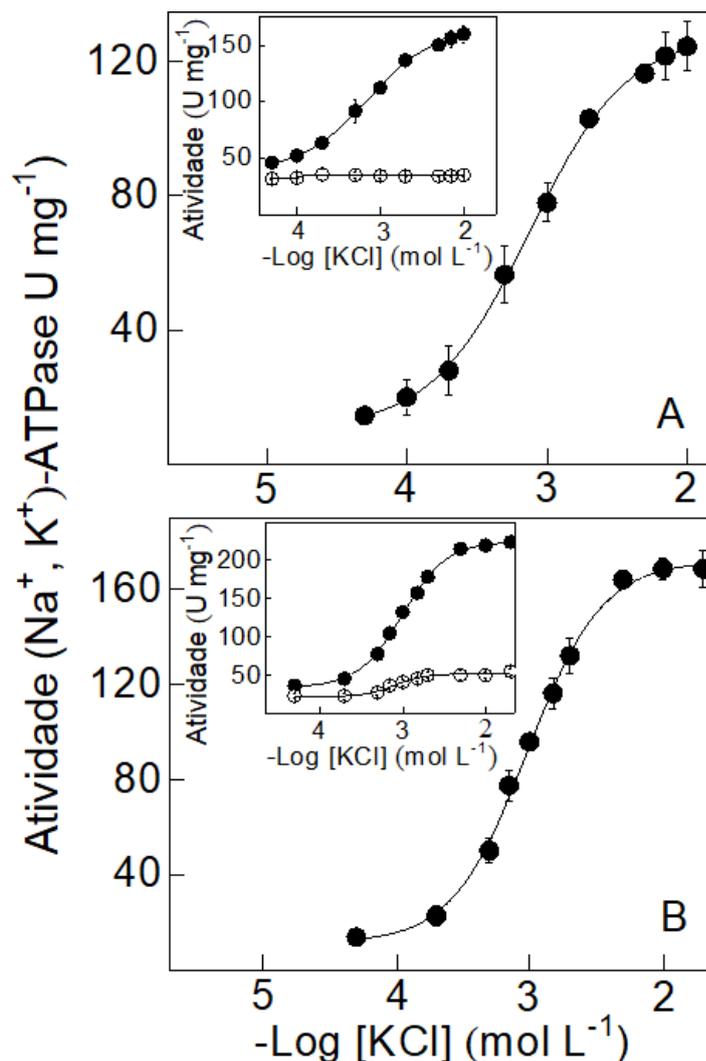


Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, em tampão HEPES 50 mmol L^{-1} , pH 7.5, contendo ATP $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ (ambas as condições) MgCl_2 $2,0\text{ mmol L}^{-1}$ (ou $0,5\text{ mmol L}^{-1}$), KCl 10 mmol L^{-1} (ambas as condições), NADH $0,21\text{ mmol L}^{-1}$, FEP $3,18\text{ mmol L}^{-1}$, 89 U PQ e 94 U LDH para recém-capturados (ou aclimatados à amônia). A reação foi iniciada pela adição de $12\text{ }\mu\text{g}$ de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=$

3). A figura apresentada corresponde aos valores médios (\pm SD). **A**- Recém-capturado. **B**- Aclimatado à amônia. **Inserção:** A e B: atividade ATPase insensível à ouabaína (\square); atividade ATPase total (\bullet).

Figura 5 - Efeito da concentração de K^+ na atividade (Na^+, K^+) -ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum* recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias.

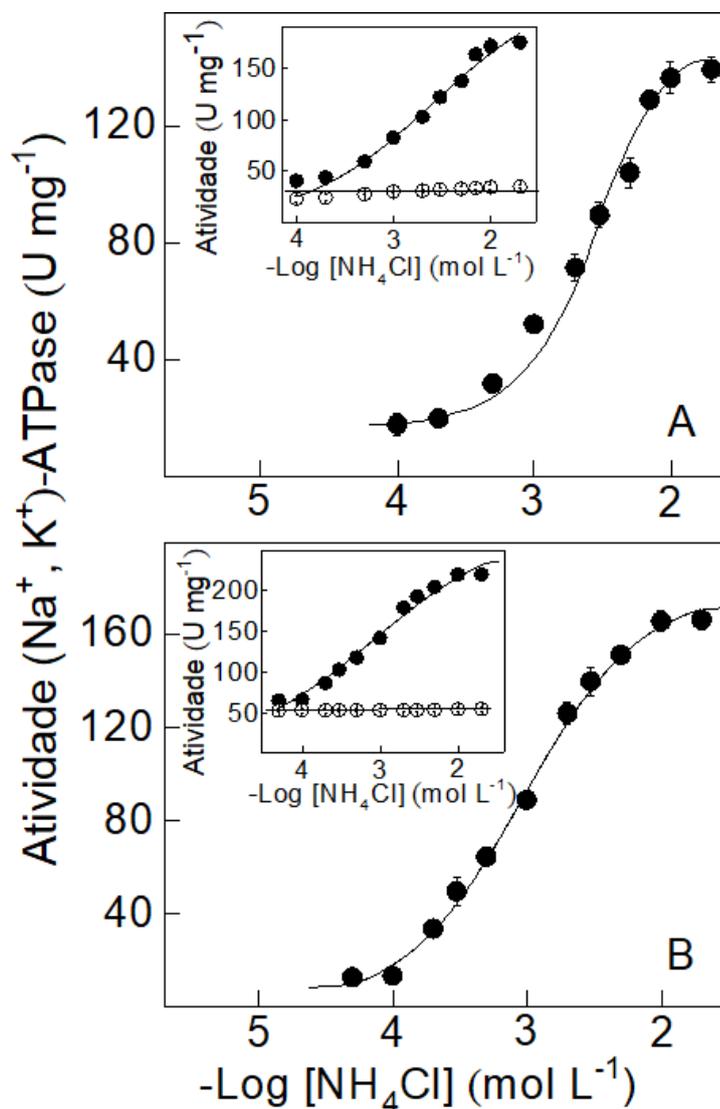


Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7.5, contendo ATP 1,0 mmol L⁻¹ (ambas as condições), MgCl₂ 2,0 mmol L⁻¹ (ou 0,5 mmol L⁻¹), NaCl 50mmol L⁻¹ (ou 15 mmol L⁻¹), NAD⁺ 4,28 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 24 U GAFDH e 9 U FGQ para

recém-capturados (ou aclimatados à amônia). A reação foi iniciada pela adição de 12 μg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias ($N=3$). A figura apresentada corresponde aos valores médios (\pm SD). **A-** Recém-capturado. **B-** Aclimatado à amônia. **Inserção:** A e B: atividade ATPase insensível à ouabaína (\square); atividade ATPase total (\bullet).

Figura 6 - Efeito da concentração de NH_4^+ na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum* recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 $^{\circ}\text{C}$, em tampão HEPES 50 mmol L^{-1} , pH 7.5, contendo ATP 1,0 mmol L^{-1} (ambas as condições), MgCl_2 2,0 mmol

L⁻¹ (ou 0,5 mmol L⁻¹), NaCl 50 mmol L⁻¹ (ou 15 mmol L⁻¹), NAD⁺ 4,28 mmol L⁻¹, fosfato de sódio 1 mmol L⁻¹, gliceraldeído-3-fosfato 2 mmol L⁻¹, 24 U GAFDH e 9 U FGQ para recém-capturados (ou aclimatados à amônia). A reação foi iniciada pela adição de 12 µg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogeneizados de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios (± SD). **A-** Recém-capturado. **B-** Aclimatado à amônia. **Inserção:** A e B: atividade ATPase insensível à ouabaína (◻); atividade ATPase total (●).

Concentrações crescentes de ouabaína entre 5.10⁻⁶ e 3.10⁻² mol L⁻¹ inibiram a atividade ATPase total da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* recém-capturado no Rio Grande ou aclimatado em 4,9 mg L⁻¹ de amônia total em 78% (Fig. 7A) ou 75% (Fig. 7B). Os valores iniciais da atividade ATPase, 164,3 ± 4,9 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína ou 221,8 ± 5,9 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, diminuíram até 36,5 ± 1,7 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína ou 55,3 ± 2,8 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína na presença de ouabaína 3.10⁻³ mol L⁻¹, para camarões recém-capturados ou aclimatados à amônia. A determinação gráfica da constante de inibição utilizando a representação de Dixon resultou em um valor de K_I = 0,14 ± 0,01 mmol L⁻¹ ou 0,11 ± 0,01 mmol L⁻¹ para camarões recém-capturados ou aclimatados à amônia. (inserções da Figura 7). O aspecto monofásico obtido para a curva de inibição da atividade ATPase pela ouabaína sugere a existência de um único sítio de ligação na molécula da (Na⁺, K⁺)-ATPase do *M. amazonicum*, independente da condição.

Na Tabela 2 estão resumidos os valores dos parâmetros cinéticos calculados para os diferentes moduladores da atividade da (Na⁺, K⁺)-ATPase presente na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* recém-capturados do Rio Grande e aclimatado à 4,9 mg L⁻¹ de amônia total.

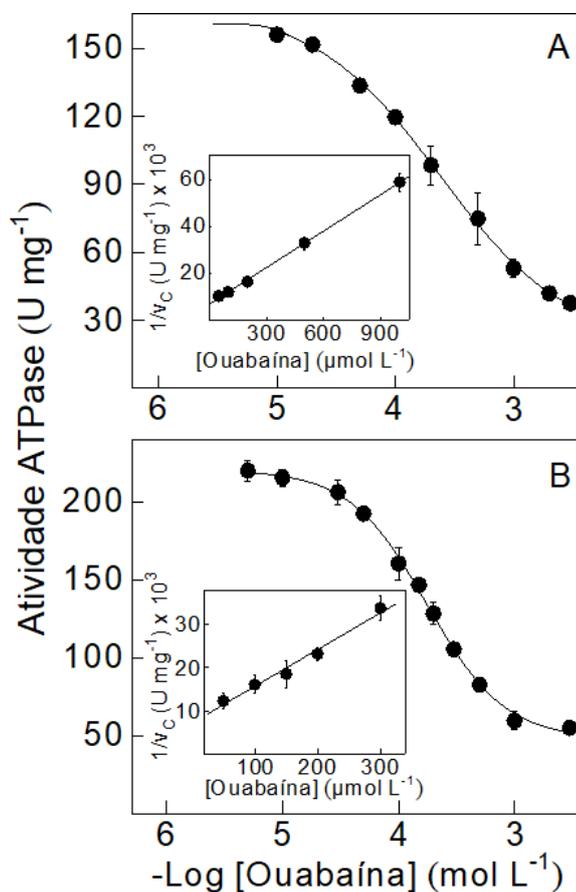
Para esclarecer a natureza das ATPases insensíveis à ouabaína presentes na fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* do Rio Grande recém-capturado ou aclimatado a 4,9 mg L⁻¹ de amônia total, foram utilizados diferentes inibidores combinados com a ouabaína (Tabela 3). Observa-se que a atividade ATPase total é da ordem de 164,3 ± 7,3 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína para animais recém-capturados ou 220,0 ± 7,3 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína para animais aclimatados à amônia, enquanto a atividade ATPase insensível a ouabaína, estimada na presença de ouabaína 3 mmol L⁻¹ foi de 36,5 ± 1,7 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína ou 55,2 ± 3,5 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína para recém-capturado ou aclimatado à amônia, respectivamente, confirmando portanto que (Na⁺, K⁺)-ATPase corresponde a cerca de 78% (127,8 ± 3,5 nmol Pi min⁻¹

mg⁻¹ de proteína) ou 75% (165,0 ± 6,1 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) da atividade ATPase total para recém-capturado ou aclimatado à amônia, respectivamente. Um valor similar foi estimado na presença de ortovanadato, o que elimina a presença de outras ATPases do tipo P. Os valores estimados na presença de ouabaína mais tapsigargina e ouabaína mais EGTA, indicam a presença de Ca²⁺-ATPase, representando aproximadamente 6% da ATPase total em ambas as condições. A aclimação de *M. amazonicum* em concentrações seguras de amônia aumentaram a atividade de uma K⁺-ATPase e V(H⁺)-ATPase em 2,4 vezes.

4.3 ELETROFORESE E WESTERN BLOTTING

A eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) revelou perfis de proteínas bastante complexos (Fig. 8). A diferença no perfil de proteína observada para camarões expostos à amônia aparentemente sugere mudanças na expressão da proteína em resposta à exposição à amônia (Fig. 8A). Os dados de Western blotting identificaram uma única banda imunorreativa de cerca de 120 kDa para camarões recém-capturados, no entanto, os camarões expostos a amônia revelaram uma banda imunorreativa com cerca de 120 kDa e outra banda levemente difusa em 130 kDa (Fig. 8B).

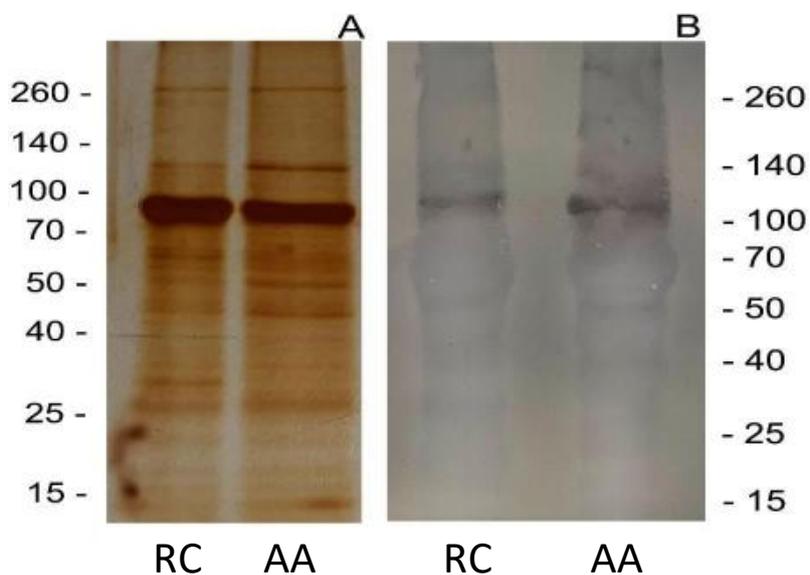
Figura 7 - Efeito da concentração de ouabaína na atividade ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A atividade da enzima foi determinada continuamente a 25 °C, em tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 7.5, contendo ATP 1,0 mmol L⁻¹ (ambas as condições), MgCl₂ 2,0 mmol L⁻¹ (ou 0,5 mmol L⁻¹), NaCl 50mmol L⁻¹ (ou 15 mmol L⁻¹), KCl 10 mmol L⁻¹ (ambas as condições), NADH 0,21 mmol L⁻¹, FEP 3,18 mmol L⁻¹, 89 U PQ e 94 U LDH para recém-capturados (ou aclimatados à amônia). A reação foi iniciada pela adição de 12 μg de proteína. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando-se três diferentes homogêneos de brânquias (N= 3). A figura apresentada corresponde aos valores médios (± SD). **A-** Recém-capturado. **B-** Aclimatado à amônia. **Inserção:** representação de Dixon para a determinação da constante de inibição K_I.

Figura 8 - SDS-PAGE e Western blotting da fração microsomal do tecido branquial de *M. amazonicum* recém-capturado e aclimatado à amônia por 10 dias.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A eletroforese foi realizada em gradiente de gel de poliacrilamida de 5 a 20% utilizando 4 μ g para o controle e camarões aclimatados à amônia. O gel foi corado com nitrato de prata (**Fig. 8A**). **B**- Western blotting contra a subunidade α da (Na^+, K^+) -ATPase e a seguir com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, conforme descrito em Materiais e Métodos usando 70 μ g proteína para ambas as condições. **RC**- Recém-capturado. **AA**- Aclimatado à amônia por 10 dias.

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos calculados para os moduladores da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial de *Macrobrachium amazonicum* recém-capturado do Rio Grande e aclimatado a 4,9 mg L⁻¹ amônia total. Os ensaios foram realizados em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, em um volume final de 1,0 mL. O efeito de cada modulador foi avaliado em concentração ótima dos outros. Os valores são a média ± SD para 3 (n= 3) diferentes preparações microsomais compreendendo um total de 240 brânquias em cada.

Modulador	V _M (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)		K _{0,5} or K _M (mmol L ⁻¹)		n _H	
	Recém-capturado	aclimatado NH ₃	Recém-capturado	aclimatado NH ₃	Recém-capturado	aclimatado NH ₃
ATP	137,3 ± 8,1	170,5 ± 6,5	0,083 ± 0,010	0,106 ± 0,010	1	1
Mg ²⁺	135,6 ± 2,5	164,9 ± 5,2	0,16 ± 0,011	0,178 ± 0,013	2,2	3,9
Na ⁺	134,2 ± 4,3	169,6 ± 4,9	5,5 ± 0,48	4,9 ± 0,37	1,5	2,4
K ⁺	132,3 ± 5,6	168,2 ± 5,3	0,75 ± 0,14	0,97 ± 0,12	1,4	1,6
NH ₄ ⁺	149,2 ± 7,1	169,4 ± 5,4	2,5 ± 0,27	1,01 ± 0,20	1,3	1,3
			K _I (mmol L ⁻¹)			
Ouabaína	-	-	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01	-	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Tabela 3 – Efeito de diversos inibidores na atividade ATPase de homogenados da fração microsomal de *Macrobrachium amazonicum* recém-capturado do Rio Grande e aclimatado em 4.9 mg L⁻¹ amônia total. As velocidades iniciais foram medidas continuamente em 25 °C em tampão HEPES 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, usando duplicatas (≈ 12 µg de proteína) da mesma preparação. Os valores são a média ± SD para 3 (n= 3) diferentes preparações microsomais compreendendo um total de 240 brânquias em cada.

Inibidor	V _M (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)		Residual activity (%)		Tipo de ATPase presente
	Recém-capturado	aclimatado NH ₃	Recém-capturado	aclimatado NH ₃	
Nenhum (Controle)	164,3 ± 4,9	220,7 ± 9,4	100	100	
Ouabaína (3 mmol L ⁻¹), OUA	127,8 ± 3,5	165,5 ± 10,8	77,8	66,8	Na ⁺ , K ⁺ -
Atividade insensível à ouabaína					
Ouabaína(3 mmol L ⁻¹), OUA	36,5 ± 1,7	55,2 ± 3,5	22,2	25,0	-
Ortovanadato (0,1 mmol L ⁻¹), ORT	34,0 ± 2,2	54,2 ± 6,2	20,6	24,6	-
OUA + ORT	31,5 ± 1,9	58,8 ± 13,6	19,2	26,7	-
OUA + Teofilina (5 mmol L ⁻¹)	32,2 ± 2,8	50,2 ± 5,7	2,6	2,2	Fosfatase neutra
OUA + Ácido Etacrínico (2 mmol L ⁻¹)	27,1 ± 2,6	31,9 ± 3,1	5,7	10,5	Na ⁺ - ou K ⁺ -
OUA + Tapsigargina (0,5 µmol L ⁻¹)	29,6 ± 1,6	41,1 ± 4,2	4,2	6,3	Ca ²⁺ -
OUA + Bafilomicina A ₁ (0.4 µmol L ⁻¹)	22,4 ± 1,3	20,2 ± 4,5	8,6	15,8	V(H ⁺)-
OUA + Aurovertina B (10 µmol L ⁻¹)	36,2 ± 3,0	51,5 ± 3,6	-	1,6	F ₀ F ₁ -
OUA + EGTA (1,0 mmol L ⁻¹)	30,3 ± 2,4	40,2 ± 4,1	3,8	6,8	Ca ²⁺ -
OUA + Etanol (20 µL mL ⁻¹)	37,2 ± 2,3	56,2 ± 1,2	-	-	-
OUA + DMSO (20 µL mL ⁻¹)	36,0 ± 2,2	54,5 ± 0,6	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

5 DISCUÇÃO

Nos sistemas de produção de camarões, a qualidade da água dos viveiros é fundamental para o sucesso da aquicultura, a fim de alcançar bons índices de produtividade. Os parâmetros de qualidade da água, tais como: oxigênio dissolvido, temperatura, pH, dureza, alcalinidade total, concentrações de nitrito e nitrato, durante a execução deste estudo, permaneceram dentro da faixa relatada por outros autores como aceitáveis para a produção de *M. amazonicum* e outras espécies (Sampaio et al., 2007; Vasquez et al., 1989; New, 2002; Coler et al. 1999; Timmons et al. 2002; Kozák et al. 2011; Moraes-Valenti e Valenti 2010). Portanto, nenhum dos parâmetros de qualidade da água medidos neste estudo foi limitante ou estressante para os camarões. Assim, pode-se argumentar que os efeitos observados foram decorrentes da adição de amônia total.

O aumento da concentração de amônia nas lagoas se deve à decomposição da matéria orgânica, como alimentos não consumidos e fezes. A ingestão de alimentos com excessivo teor proteico e/ou com desbalanço na sua composição em aminoácidos aumenta a excreção de amônia pelos camarões. A amônia pode ser removida por meio de nitrificação bacteriana ou desnitrificação bacteriana por nitrito, um intermediário no ciclo do nitrogênio. Dependendo da concentração, visto que amônia é tóxica aos camarões, faz-se necessário a adoção de estratégias que evitem o seu acúmulo excessivo na água ao longo do cultivo (Kubitza, 2003). Em viveiros de cultura, a concentração de amônia total pode aumentar até 6,497 mg L⁻¹ mesmo com frequentes trocas de água (Chen et al., 1989). Portanto, camarões cultivados são comumente expostos a concentrações enriquecidas de amônia e o acúmulo de amônia na água e seus efeitos são, portanto, uma preocupação primordial na pesquisa sobre ecotoxicidade na aquicultura (Chang et al., 2015; Pang et al., 2018; Liang et al., 2019).

O efeito da presença de nitrito bem como a toxicidade aguda por amônia para *Macrobrachium amazonicum* cultivado da população proveniente do Rio Amazonas já foi determinado (Dutra et al, 2016, 2020). Entretanto, devido a estruturação da população de *M. amazonicum* em três grupos distintos (Vergamini et al., 2011) determinamos a toxicidade aguda para a população da Bacia do Paraná e Paraguai.

Colt e Armstrong (1981), em sua revisão, relatam valores tóxicos de amônia não ionizada (NH₃) para crustáceos na faixa de 0,40 a 2,31 mg L⁻¹. O valor de LC50-96h determinado neste estudo ([NH₃] = 2,31 mg L⁻¹ ou Amônia total 49,27 mg L⁻¹) para adultos de *M. amazonicum* capturados no Rio Grande, são próximos aos observados para juvenis de *Penaeus monodon*, 53,4 mg L⁻¹ (Chen et al. 1990a) e adultos de *Scylla paramamosain*, 60 mg L⁻¹ (Cheng et al., 2019), porém o valor é maior do que o observado para adultos da lagosta *Hornarus arnericanus*, 5,12 mg L⁻¹ em 5°C e 3,25 mg L⁻¹ em 20°C (Young-Lai et al., 1991), juvenis de *Penaeus chinensis*, 37,71 mg L⁻¹ (Chen et al. 1990b), juvenis e adultos de *Penaeus paulensis*, 38,72 e 34,36 mg L⁻¹, respectivamente (Ostrensky e Wasielesky, 1995; Cavalli et al. 1996) e juvenis de *Litopenaeus vannamei*, em diferentes salinidades (Lin e Chen, 2001). Entretanto, o valor de LC50-96h determinado neste estudo são 50% menor que o determinado para juvenis de *Eriocheir sinensis*, 119,67 mg L⁻¹ (Hong et al. 2007). Quando comparamos o valor de LC50-96h de *M. amazonicum* neste estudo aos cultivados que são provenientes da Bacia Amazônica (Dutra et al., 2016), observamos que espécimes da Bacia do Paraná e Paraguai são 1,3 vezes mais resistentes à amônia, indicando mais uma diferença dentre as já observadas para as populações de *M. amazonicum* que ocupam diversos habitats no Brasil, que incluem diferentes características biológicas quanto à fecundidade, proporção macho/fêmea, número de fases larvais e quanto à capacidade osmorregulatória (Anger et al., 2009; Maciel e Valenti, 2009; Charmantier e Anger, 2011; Hayd e Anger, 2013), indicando um incipiente processo de especiação (Anger et al., 2009; Vergamini et al., 2011).

Os testes de toxicidade aguda, apesar de fornecer a letalidade relativa de um tóxico, não podem prever se concentrações subletais exercerão efeitos negativos sobre o organismo (Chen e Lin, 1992). Sprague (1971) cita que um nível de segurança poderia ser obtido multiplicando o valor de LC50-96h por um fator de 0,1, sugerindo que além de não ser letal, até essa concentração é possível que o animal prospere. Portanto, as investigações sobre a exposição subletal ou a incorporação de medidas fisiológicas durante os testes de toxicidade aguda podem fornecer informações importantes e mais abrangentes, particularmente para avaliações de risco ambiental e manejo da aquicultura (Dahl et al., 2006). Estudos mais recentes têm mostrado uma discrepância substancial

entre a concentração teórica “segura” ($0.1 \times LC_{50-96h}$) e a concentração tóxica máxima aceitável (MATC). O valor da concentração “segura” de *Panaeus penicillatus* para amônia total foi descrita como $3,87 \text{ mg L}^{-1}$, entretanto, 3 mg L^{-1} foi suficiente para reduzir o crescimento dessa mesma espécie em 14 dias (Chen e Lin, 1992b). Além disso, com base nos valores de LC_{50-96h} de Allan et al. (1990), as concentrações “seguras” para *Metapanaeus macleayi* e *Panaeus monodon* seriam teoricamente $2,6$ e $3,7 \text{ mg L}^{-1}$ amônia total, embora no mesmo experimento, o MATC fosse $0,3$ e $0,21 \text{ mg L}^{-1}$ para *M. macleayi* e *P. monodon*, respectivamente (Allan et al., 1990). No caso de juvenis de *Macrobrachium rosenbergii*, uma concentração de amônia total de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ foi suficiente para reduzir seu crescimento (Naqvi et al., 2007), implicando em um valor de LC_{50-96h} para amônia total menor que 5 mg L^{-1} , que pode ser pouco realista (Naqvi et al., 2007). A concentração segura de amônia total para *M. rosenbergii* adulto foi determinado em $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Dong et al., 2021). Aqui, mostramos uma concentração total segura de amônia de $\approx 5 \text{ mg L}^{-1}$ para *M. amazonicum*, 2 vezes maior do que para *M. rosenbergii*, sugerindo uma vantagem no cultivo desta espécie.

Os modos de absorção e eliminação de compostos nitrogenados variam, sendo influenciados por fatores abióticos (temperatura, pH, salinidade) e fatores bióticos (estágio de desenvolvimento e habilidades osmorregulatórias) (Weihrauch et al., 2004; Romano e Zeng, 2010, 2013). Foi constatado que a concentração de amônia total é mais elevada em animais que vivem em baixa salinidade (Chen et al., 1990a; Chen e Lin, 1991; Ostrensky e Wasielesky, 1995), quando comparado em animais encontrados na água do mar (Allan et al., 1990; Chen et al., 1990b; Lin e Chen, 2001; Romano e Zeng, 2013). Apesar da solubilidade da amônia não iônica ser maior em água doce (Bower e Bidwell, 1978), essa diferença na concentração da hemolinfa pode ser melhor explicada pelas diferenças entre o transporte salino e a regulação ácido-base entre as espécies marinhas e de água doce. Os animais hiperreguladores em água doce absorvem Na^+ e Cl^- da água. Juntamente com a absorção desses íons monovalentes, a amônia seria absorvida na sua forma protonada, devido aos baixos valores de pH da água doce (Dutra et al. 2016; Romano e Zeng, 2012).

Há um crescente corpo de evidências sobre a excreção ativa da amônia em espécies marinhas e de água salobra (Weihrauch et al., 1998; Weihrauch et al., 1999a; Weihrauch et al., 2002; Weihrauch et al., 2004). Entretanto, o mecanismo de excreção/

transporte de amônia em crustáceos são muito escassos, conseqüentemente, os mecanismos envolvidos não são totalmente compreendidos. Atualmente tem sido descrito que três proteínas são fundamentais para o transporte de amônia, $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase, H^+ -ATPase e proteína do tipo Rhesus (Weihrauch et al., 2004; Martin et al., 2011; Liu et al., 2014; Weihrauch e O'Donnel, 2015; Pan et al., 2018).

O modelo aceito para a excreção de amônia pelas brânquias de crustáceos indica que o íon amônio entra no epitélio branquial diretamente via $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase e por canais de K^+ , neste último impulsionado provavelmente pelo potencial negativo da célula. A amônia não ionizada se difunde para o interior de vesículas acidificadas, sendo transformada em íon amônio e aprisionada em seu interior. As vesículas carregadas de íon amônio seriam transportadas através da rede de microtúbulos em direção à membrana apical, onde o íon é liberado por exocitose no espaço subcuticular. A participação de microtúbulos na excreção de amônio foi confirmada em *Portunus trituberculatus* expostos à alta concentração de amônia (Ren et al., 2015). O íon amônio também pode ser excretado para o ambiente por meio do transportador $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ localizado apicalmente. Além disso o trocador H^+ /cátion colocalizado com uma proteína Rh facilita a excreção de amônia (Weihrauch et al., 2004; Weihrauch e O'Donnel, 2015; Romano e Zang, 2013; Valência-Castaneda et al., 2018; Zhao et al., 2020).

A alteração no padrão das proteínas expressas para *M. amazonicum* visto na SDS-PAGE indica que expressões diferenciais podem ocorrer para essa espécie após aclimação em concentrações seguras de amônia por 10 dias. Para camarões recém-capturados, uma única banda imunoreativa sugere a expressão de uma única subunidade α da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase, como relatado para diferentes populações de *M. amazonicum* (Fabri et al. 2019; Leone et al. 2014), mas também característica de muitos crustáceos (Lucu and Flik 1999; Towle et al. 2001; Leone et al. 2015; Garçon et al., 2021). No entanto, deve-se ressaltar um peso molecular relativamente maior da população do Rio Grande em relação ao relatado para a população da Amazônia (Leone et al. 2014) e do Rio Tietê (Fabri et al. 2019), de cerca de 108 e 110 kDa, respectivamente. Por outro lado, os camarões aclimatados à amônia mostraram a presença de duas bandas imunorreativas, corroborando a existência de duas isoformas da subunidade α , como visto para *Dilocarcinus pagei* (Furriel et al. 2010) e *Callinectes sapidus* (Lovett et al. 2006). As isoformas expressas em *C. sapidus* possuem peso molecular similar quando comparada

as de *M. amazonicum* aclimatados à amônia (Mr de 115 e 131 kDa), além da expressão da isoforma de maior peso molecular variar com a exposição crônica do siri em água diluída (Lovett et al. 2006). Duas isoformas da subunidade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foram expressas no intestino de *Artemia salina* (Cortas et al. 1989) e dois diferentes cDNAs para a subunidade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foram identificados para as brânquias de *Pachygrapsus marmoratus* (Jayasundara et al. 2007). A alteração da expressão de muitas proteínas de membrana nas brânquias, como $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, $\text{V}(\text{H}^+)\text{-ATPase}$, K^+ channels, trocador Na^+/H^+ e $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, proteínas tipo Reshus (Rh) e anidrase carbônica, depois que os crustáceos foram expostos à ambientes com alta concentração de amônia estão correlacionados ao transporte ativo de amônia nas brânquias (Hong et al. 2007; Martin et al. 2011; Liu et al. 2014; Ren et al. 2015; Pinto et al. 2016, Pan et al. 2018; Hans et al. 2018).

A aclimação de *Macrobrachium amazonicum* a 4,9 mg L⁻¹ de amônia total aumentou a atividade da enzima $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ em 1.3 vezes. Muitas espécies de crustáceos mostraram um aumento da excreção de amônia e na atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ branquial, incluindo *Penaeus chinensis* (Chen e Nan, 1992), *Macrobrachium nipponense* (Wang et al., 2003), juvenis de *Portunuspelagicus* (Romano e Zeng, 2010, 2011) e *M. amazonicum* cultivados (Pinto et al., 2016). Além disso, experimentos in vitro mostraram que a adição de amônia em frações microsomais de brânquias provocam uma estimulação da atividade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ para *Macrobrachium olfersii* (Furriel et al., 2004), *Callinectes danae* (Masui et al., 2002, 2005) e *Callinectes ornatos* (Garçon et al., 2007, 2009), embora com características cinéticas diferentes. *M. amazonicum* proveniente da bacia amazônica mostra que a estimulação sinérgica pelo K^+ mais NH_4^+ da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é estágio específica e que poderia sustentar a excreção ativa de NH_4^+ devido à exposição de um segundo sítio de ligação para NH_4^+ , denominado “extra-pumping”. O aumento da atividade máxima da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ sugere que para adultos a enzima exibe dois sítios diferentes, um específico para K^+ e outro específico para NH_4^+ . Na presença de NH_4^+ ambos os locais são ocupados e a atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é estimulada a valores maiores do que para K^+ sozinho. No entanto, o aumento das concentrações de K^+ desloca o NH_4^+ ligado do local de ligação do K^+ , e a conseqüente ligação do K^+ ao seu próprio local estimula ainda mais a atividade enzimática (Leone et al., 2014). A atividade $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ da população do Rio

Grande é similar na presença de concentrações saturantes de potássio e/ou amônio, assim como observado para a população do rio Tietê (Fabri et al., 2019). A afinidade da enzima para potássio é similar nos camarões recém-capturados ou aclimatados à amônia, entretanto para os animais recém-capturados a afinidade para K^+ é 3,3-vezes maior comparado ao NH_4^+ . Apesar de não existir estimulação sinérgica por K^+ e NH_4^+ para a população do Rio Grande, a exposição de *M. amazonicum* à amônia aumenta a afinidade da enzima para NH_4^+ , favorecendo sua retirada da hemolinfa. Essa modificação da afinidade da enzima para NH_4^+ pode estar ligada a expressão de uma subunidade α diferente.

A exposição dos camarões à concentração segura de amônia aumentou a atividade de uma ATPase estimulada por K^+ e de uma ATPase estimulada por H^+ em comparação com camarões recém-capturados. Os dados relatados neste documento sugerem que, apesar de nenhum mecanismo ter sido proposto para camarões de água doce, a excreção de amônia não deve ser muito diferente daquela proposta para *Carcinus maenas* (Weihrauch e O'Donnell 2015). A amônia ionizada entraria na célula branquial através da ação de (Na^+, K^+) -ATPase e K^+ -ATPase, e a excreção de amônia na região subcuticular envolveria vesículas acidificadas de $V(H^+)$ -ATPase.

Embora exista uma relação entre o aumento da tolerância à amônia em ambientes com maior salinidade (Chen e Lin, 1992; Ponce-Palafox et al., 1997; Lin e Chen, 2001), *M. amazonicum* da Bacia Paraná/ Paraguai apresenta uma alta tolerância a amônia quando comparada a outras espécies de camarões. A aclimação da espécie em 4.9 mg L^{-1} por 10 dias não causou mortalidade, letargia ao qualquer outro indício de sofrimento aos animais. Devido a esse fato, é possível especular que a manutenção de uma qualidade de água adequada para a maturação dessas espécies pode ser alcançada através de taxas de câmbio mais baixas. Além de reduzir a mão-de-obra, eletricidade (principalmente para aquecimento e bombeamento) e as necessidades gerais de água, menores taxas de troca de água podem resultar em um ambiente mais estável para o camarão, especialmente quando os parâmetros físicos (por exemplo, temperatura e salinidade) e microbiológicos também são considerados.

Concluindo, a aclimação de *M. amazonicum* capturados do Rio Grande em uma condição segura de amônia, ativa enzimas chaves no processo de excreção ativa deste composto tóxico, aumentando a atividade da (Na^+, K^+) -ATPase, $V(H^+)$ -ATPase e K^+

ATPase, além de expressar uma segunda isoforma para a subunidade α e aumentar a afinidade da $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ por NH_4^+ , minimizando os efeitos tóxicos causados pela exposição. Devido à variabilidade genética entre as populações de *M. amazonicum* encontradas em diferentes regiões do Brasil, também podemos inferir que a população encontrada na bacia do Paraná-Paraguai é relativamente mais tolerante à presença de compostos nitrogenados. Apesar dos avanços no conhecimento sobre a toxicidade da amônia, mais estudos são necessários para melhorar a determinação da concentração tóxica máxima aceitável e a confirmação de um modelo de excreção de amônia em camarões de água doce.

REFERÊNCIAS

Abe MP, Fróes CN, Prentice-Hernández C, Wasielesky Júnior WF, Cavalli RO. Substituição da farinha de peixe por farelo de soja em dietas práticas do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). *Ciência Rural*. 2008, Jan-fev. 38(Pt1): 219-224.

Adlimoghaddam A, Boeckstaens M, Marini AM, Treberg JR, Brassinga AK, Weihrauch D. Ammonia excretion in *Caenorhabditis elegans*: mechanism and evidence of ammonia transport of the Rhesus protein CeRhr-1. *J Exp Biol*. 2015 Mar;218(Pt 5):675-83. doi: 10.1242/jeb.111856. PMID: 25740900; PMCID: PMC4495467.

Allan GL, Maguire GB, Hopkins SJ. Acute and chronic toxicity of ammonia to juvenile *Metapenaeus macleayi* and *Penaeus monodon* and the influence of low dissolved-oxygen levels. *Aquaculture*, 1990 April; 91(Pt1): 265–280.

Alonso A, Camargo JA. Toxic Effects of non-ionized Ammonia on Survival and Feeding Activity of the Freshwater Amphipod *Eulimnogammarus toletanus* (Gammaridae, Crustacea). *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 2004. 72: 1052-1058.

Anger K, Hayd LA, Knott J, Nettelmann U. Patterns of larval growth and chemical composition in the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquacult*. 2009 Feb; 287(Pt3): 341-348.

Anger K. Hayd L. Feeding and growth in early larval shrimp *Macrobrachium amazonicum* from the Pantanal, southwestern Brazil. *Aquat. Biol*. 2010, June; 9(Pt1): 251-261.

Anger K. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea, Palaemonidae), on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. *J. Crust. Biol*. 2013 Mar; 33(Pt 2): 151-183.

Aperia A. 2011 Homer Smith Award: To serve and protect: classic and novel roles for Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Aug;23(8):1283-90.

Apha- American Public Health Association, 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater. 18th ed. APHA, Washington D.C.

Araújo MC, Valenti WC. Effects of feeding strategy on larval development of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. Rev. Bras. Zootech – Braz. J. Animal Sci. 2017 Oct;46(Pt2): 85-90.

Armstrong DA, Stephenson MJ, Knight AW. Acute toxicity of nitrite to larvae of the giant Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 1976 June; 9(Pt9): 39-46.

Augusto A, Greene LJ, Laure HJ, McNamara JC. The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromous freshwater palaemonid shrimps *Macrobrachium amazonicum* and *M. olfersi* (Crustacea Decapoda). J. Crust. Biol. 2007 October; 27(Pt4): 626-634.

Augusto A, Pinheiro AS, Greene LJ, Laure HJ, McNamara JC. Evolutionary transition to freshwater by ancestral marine palaemonids: evidence from osmoregulation in a tide pool shrimp. Aquatic Biol. 2009 7(Pt1): 113-122.

Augusto AS, Valenti WC. Are there any physiological differences between the male morphotypes of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea, Palaemonidae). J. Crust. Biol. 2016 July; 36(Pt5): 716-723.

Baldwin E. Dynamic Aspects of Biochemistry. Cambridge: CambridgeUniversity Press.1947.

Barbieri E, Bondioli ACV. Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. Aquac. Res. 2015. 46 (Pt3): 565-571.

Bate S. On a new genus with four new species of freshwater shrimps. Proc. Zool. Soc. London 363-368.1868.

Bautista-Covarrubias JC, Velarde-Montes GJ, Voltolina D, García-de la Parra LM, Soto-Jiménez MF, Frías-Espericueta MG. Humoral and haemocytic responses of *Litopenaeus vannamei* to Cd exposure. ScientificWorldJournal. 2014;2014:903452. doi: 10.1155/2014/903452. Epub 2014 May 19. PMID: 24967441; PMCID: PMC4055250.

Belli NM, Faleiros RO, Firmino KC, Masui DC, Leone FA, McNamara JC, Furriel RP. Na,K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2009 Mar;152(3):431-9. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.11.017. Epub 2008 Dec 6. PMID: 19100333.

Bentes BS, Martinelli JM, Souza LS, Cavalcante DV, Almeida MC, Isaac VJ Spatial distribution of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*(Heller, 1862) (Decapoda, Caridea, Palaemonidae) in two perennial creeks of an estuary on the northern coast of Brazil (Guajará Bay, Belém, Pará). *Braz. J. Biol.* 2011 Novem;71(Pt4): 925-935.

Blaesse AK, Broehan G, Meyer H, Merzendorfer H, Weihrauch D. Ammonia uptake in *Manduca sexta* midgut is mediated by an amiloride sensitive cation/proton exchanger: Transport studies and mRNA expression analysis of NHE7, 9, NHE8, and V-ATPase (subunit D). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2010 Dec;157(4):364-76. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.08.004. Epub 2010 Aug 7. PMID: 20696265.

Boscolo WR, Hayashi C, Meurer F, Feiden A, Bombardelli RA. Digestibilidade Aparente da Energia e Proteína das Farinhas de Resíduo da Filetagem da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da Corvina (*Plagioscion squamosissimus*) e Farinha Integral do Camarão Canela (*Macrobrachium amazonicum*) para a Tilápia do Nilo. *Rev. Bras. Zootec.* 2004 July ; 33(Pt7):8-13.

Boudour-Bouchecker N, Boulo V, Lorin-Nebel C, Elguero C, Grousset E, Anger K, Charmantier-Daures M, Charmantier G. Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs. *Cell Tissue Res*. 2013 Jul;353(1):87-98. doi: 10.1007/s00441-013-1622-x. Epub 2013 Apr 25. PMID: 23616029.

Bower CE, Bidwell JP. Ionization of ammoniain seawater: effects of temperature, pH and salinity. *J. Fish. Res. Bd Can.* 1978 July; 35(Pt7):1012-1016.

Boyd C, Zimmemann S. Freshwater Prawns, Biology and Farming. In: M.B. New, W.C. Valenti, J.H. Tidwell, L.R. D'Abramo, M.N. Kutty (Eds.) *Grow-Out Systems – Water Quality and Soil Management*. Chapter 13. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.2010.

Brazão CC, Kracizy RO, Dutra FM, Oliveira AP, Silva RI, Ballester, ELC. Combined and isolated effects of ammonia and nitrite on Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) juveniles. *Aquacult*. 2021 Febr; 533(Pt1):736204.

Bridger CJ, Garber AF. *Ecological Aquaculture: The Evolution of the Blue Revolution*. Oxford, Blackwell Science Ltd. p. 77-102. 2002.

Cagol L, Santos LD, Pontes TC, Zadinelo IV, Battester ELC. Replacement of protein source in practical diets for amazon river prawn. *Boletim do instituto de pesca*. 2018 Novem;44(Pt1):60-67.

Campbell JW. Nitrogen excretion. In C.L. Prosser (Ed.) *Comparative Animal Physiology*. 279-316. W.B. Saunders Co., Philadelphia.1973.

Campos BR, Miranda-Filho KC, D'Incao F, Poersch L, Wasielesky W Toxicidade aguda da amônia, nitrito e nitrato sobre os juvenis de camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* (LATREILLE, 1817) (Crustacea: Decapoda). *Atlântica*, Rio Grande. 2012 Feb;34(pt1):75-81.

Cavalli RO, Wasielesky WJ, Franco CS, Miranda Filho KC. Evaluation of the short-term toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Penaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda) broodstock. *Arq. Biol. Tecnol*. 1996 Mar;39 (Pt1):567-575.

Cerenius L, Jiravanichpaisal P, Liu HP, Söderhill I. Crustacean immunity. *Adv Exp Med Biol*. 2010;708:239-59.

Chang CC, Rahmawaty A, Chang ZW. Molecular and immunological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to the organophosphorus insecticide, trichlorfon. *Aquat Toxicol*. 2013 Apr 15;130-131:18-26. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.12.024. Epub 2013 Jan 8. PMID: 23340335.

Chang ZW, Chiang PC, Cheng W, Chang CC. Impact of ammonia exposure on coagulation in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015 Aug;118:98-102. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.04.019. Epub 2015 Apr 29. PMID: 25916769.

Charmantier G, Anger K. Ontogeny of osmoregulatory patterns in the South American shrimp *Macrobrachium amazonicum*, Loss of hypo-regulation in a land-locked population indicates phylogenetic separation from estuarine ancestors. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2011 Oct;396: 89–98.

Charmantier G, Soyeux C. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1994 January;178(Pt1):233-246.

Chen J, Lui P, Lei S. Toxicities of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* adolescents. *Aquaculture* 1990a Sept ; 89(Pt2):127-137.

Chen J, Ting Y, Lin J, Lin M. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles. *Mar. Biol.* 1990b Aug;107: 427-431.

Chen J. Study on the free amino acid levels in the hemolymph, gill, hepatopancreas and muscle of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient ammonia. *Aquat Toxicol.* 2000 Aug 1;50(1-2):27-37. doi: 10.1016/S0166-445X(99)00095-8. PMID: 10930648.

Chen JC, Cheng SY, Chen CT. Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1994 Mar;109A(Pt2): 339-347.

Chen JC, Kou YZ. Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture.* 1993 Jan;109(Pt2):177-185.

Chen JC, Lin CY. Lethal effects of ammonia on *Penaeus chinensis* Osbeck juvenile at different salinity level.

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 1992 Jan;156:139-148.

Chen JC, Liu PC, Lin YT, Lee CK. Highly intensive culture study of tiger prawn *Penaeus monodon* in Taiwan. In: De Pauw, D., Jaspers, E., Ackefors, H., Wilkins, N. (Eds.), *Aquaculture—A Biotechnology in Progress*. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp. 377–382.1989.

Chen JC, Nan FH. Effect of ambient ammonia on ammonia-N excretion and ATPase activity of *Penaeus chinensis*. *Aquatica Toxicology* 1992 Feb; 23:1-10.

Cheng CH, Ma HL, Su YL, Deng YQ, Feng J, Xie JW, Chen XL, Guo ZX. Ammonia toxicity in the mud crab (*Scylla paramamosain*): The mechanistic insight from physiology to transcriptome analysis. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019 Sep 15;179:9-16. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.04.033. Epub 2019 Apr 22. PMID: 31022654.

Clarke RJ. Mechanism of allosteric effects of ATP on the kinetics of P-type ATPases. *Eur Biophys J.* 2009 Dec;39(1):3-17. doi: 10.1007/s00249-009-0407-3. Epub 2009 Feb 19. PMID: 19225774.

Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front Physiol.* 2017 Jun 6;8:371. doi: 10.3389/fphys.2017.00371. PMID: 28634454; PMCID: PMC5459889.

Clausen T. Na⁺-K⁺ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiol Rev.* 2003 Oct;83(4):1269-324. doi: 10.1152/physrev.00011.2003. PMID: 14506306.

Cochrane DR, Jacobsen BM, Connaghan KD, Howe EN, Bain DL, Richer JK. Progesterin regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 May 15;355(1):15-24. doi: 10.1016/j.mce.2011.12.020. Epub 2012 Jan 18. PMID: 22330642; PMCID: PMC4716679.

Coler RA, Watanabe RA, Xavier BF, Paz RJ. A preliminary report on the application of *Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862 (Decapoda: Palaemonidae) as a biomarker. *Hydrobiol.* 1999 June;412:119-121.

Collart OO, Rabelo H. Variation in egg size of the fresh-water prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). J. Crust. Biol. 1996 June;16(Pt4):684-688.

Collart OO. Interactions entre le parasite *Probopyrus bithynis* (Isopoda, Bopyridae) et l'un de ses hôtes, la crevette *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). Crustaceana 1990 Jan;58(Pt3): 258-269.

Colt JE, Armstrong DA. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and molluscs. In: Allen, L.J., Kinney, E.C. (Eds.), Proceedings of the Bioengineering Symposium for Fish Culture Section. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp. 34-47.1981.

Contreas BR, Yi WY, Fitzsimmons F. Environmental and economic impacts of tilapia and shrimp polycultures. In: Aquaculture America. 2003.p. 107.

Cornelius F, Kanai R, Toyoshima C. A structural view on the functional importance of the sugar moiety and steroid hydroxyls of cardiotonic steroids in binding to Na,K-ATPase. J Biol Chem. 2013 Mar 1;288(9):6602-16.

Cortas N, Arnaout M, Salon J, Edelman IS. Isoforms of Na,K-ATPase in *Artemia salina*: II. Tissue distribution and kinetic characterization. J Membr Biol. 1989 May;108(2):187-95.

Crambert G, Li C, Swee LK, Geering K. FXD7, mapping of functional sites involved in endoplasmic reticulum export, association with and regulation of Na,K-ATPase. J Biol Chem. 2004 Jul 16;279(29):30888-95.

Dahl U, Gorokhova E, Breitholtz M. Application of growth-related sublethal endpoints in ecotoxicological assessments using a harpacticoid copepod. Aquat Toxicol. 2006 May 25;77(4):433-8.

Daoust PY, Ferguson HW. The pathology of chronic ammonia toxicity in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Dis. 1984 May;7:199-205.

- De Freitas Rebelo M, Rodriguez EM, Santos EA, Ansaldo M. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2000 Feb;125(2):157-64.
- De Grave S, Fransen CHJM. *Carideorum Catalogus: The recent species of the Dendrobranchiate, Stenopodidean, Procarididean and Caridean shrimps (Crustacea: Decapoda)*. Zool. Medel. Leiden 2011. 85:195-588.
- De Lourdes Cobo, M., Sonnenholzner, S., Wille, M., Sorgeloos, P., 2014. Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquac. Res.* 2014 ;45(Pt3) :470-475.
- Deng WB, Tian Z, Liang XH, Wang BC, Yang F, Yang ZM. Progesterone regulation of Na/K-ATPase β 1 subunit expression in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Theriogenology*. 2013 May;79(8):1196-203.
- Dos Santos A, Hayd L, Anger K. A new species of *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae), *M. pantanalense*, from the Pantanal, Brazil. *Zootaxa*. 2013;3700:534-46.
- Duan Y, Zhang J, Wang Y, Liu Q, Xiong D. Nitrite stress disrupts the structural integrity and induces oxidative stress response in the intestines of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol*. 2018 Jan;329(1):43-50.
- Duru R, Njoku O, Maduka I. Oxidative stress indicators in patients with prostate disorders in Enugu, South-East Nigeria. *Biomed Res Int*. 2014;2014:313015.
- Dutra FM, Cidemar Alab JH, Costa Gomes MK, Furtado PS, Valenti WC, Cupertino Ballester EL. Nitrate acute toxicity to post larvae and juveniles of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). *Chemosphere*. 2020 Mar;242:125229.
- Dutra FM, Freire CA, Vaz Dos Santos AM, Forneck SC, Brazão CC, Ballester EL. Acute Toxicity of Nitrite to Various Life Stages of the Amazon River Prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2016 Nov;97(5):619-625.

El-Beialy W, Galal N, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, Tei K, Totsuka Y. Effects of estrogen on PMCA 2 and 4 in human fibroblast-like synovial cells and mouse macrophage-like cells. *Endocr J.* 2010;57(1):93-7.

Emerson K, Russo RC, Lund RE, Thurston RV. Aqueous ammonia equilibrium calculations, effects of pH and temperature. *J. Fish. Res. Board Can.* 1975;32:2379-2383.

Esteves FA. *Fundamentos de Limnologia.* 2ª ed., Rio de Janeiro: Interciência, p 602, 1998.

Fabiato A. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol.* 1988;157:378-417.

Fabri LM, Lucena MN, Garçon DP, Moraes CM, McNamara JC, Leone FA. Kinetic characterization of the gill (Na⁺, K⁺)-ATPase in a hololimnetic population of the diadromous Amazon River shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2019 Jan;227:64-74.

Faleiros RO, Furriel RPM, McNamara JC. Transcriptional, translational and systemic alterations during the time course of osmoregulatory acclimation in two palaemonid shrimps from distinct osmotic niches. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2017 Oct;212:97-106.

Faleiros RO, Goldman MH, Furriel RP, McNamara JC. Differential adjustment in gill Na⁺/K⁺- and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp

Macrobrachium amazonicum (Decapoda, Palaemonidae). *J Exp Biol.* 2010 Nov 15;213(Pt 22):3894-905.

Finney DJ. *Probit analysis.* 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 1971.

França JL, Pinto MR, Lucena MN, Garçon DP, Valenti WC, McNamara JC, Leone FA. Subcellular localization and kinetic characterization of a gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J Membr Biol*. 2013 Jul;246(7):529-43.

Freire CA, Cavassin F, Rodrigues EN, Torres AH, McNamara JC. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003 Nov;136(3):771-8.

Freire CA, Maraschi AC, Lara AF, Amado EM, Prodocimo V. Late rise in hemolymph osmolality in *Macrobrachium acanthurus* (diadromous freshwater shrimp) exposed to brackish water: Early reduction in branchial Na⁺/K⁺ pump activity but stable muscle HSP70 expression. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2018 Feb;216:69-74.

Freire CA, McNamara JC. Fine structure of the gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. *J. Crust. Biol*. 1995; 15(Pt1):103-116.

Freire CA, Onken H, McNamara JC. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008 Nov;151(3):272-304.

Freire JJ, Bentes B, Fontes VB, Silva EM. Morphometric discrimination among three stocks of *Macrobrachium amazonicum* in the Brazilian Amazon. *Limnologica* 2017 Jan;64:1-10.

Freire JL, Marques CB, Bentes DSB. Growth and stock assessment of *Macrobrachium amazonicum*. Decapoda, Palaemonidae. in an estuary of northeast Pará, Brasil. *Inst. Pesca* 2012Nov;38B:215-229.

Frías-Espericueta MG, Harfush-Melendez M, Páez-Osuna F. Effects of ammonia on mortality and feeding of postlarvae shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2000 Jul;65(1):98-103.

- Fromm PO, Gillette JR. Effect of ambient ammonia on blood ammonia and nitrogen excretion of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol*. 1968 Sep;26(3):887-96.
- Furriel RP, Firmino KC, Masui DC, Faleiros RO, Torres AH, McNamara JC. Structural and biochemical correlates of Na⁺,K⁺-ATPase driven ion uptake across the posterior gill epithelium of the true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae). *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*. 2010 Oct 1;313(8):508-23.
- Furriel RP, Masui DC, McNamara JC, Leone FA. Modulation of gill Na⁺,K⁺-ATPase activity by ammonium ions: Putative coupling of nitrogen excretion and ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 2004 Jan 1;301(1):63-74.
- Füzesi M, Gottschalk KE, Lindzen M, Shainskaya A, Küster B, Garty H, Karlsh SJ. Covalent cross-links between the gamma subunit (FXVD2) and alpha and beta subunits of Na,K-ATPase: modeling the alpha-gamma interaction. *J Biol Chem*. 2005 May 6;280(18):18291-301.
- Gallo LC, Davel AP, Xavier FE, Rossoni LV. Time-dependent increases in ouabain-sensitive Na⁺, K⁺ -ATPase activity in aortas from diabetic rats: The role of prostanoids and protein kinase C. *Life Sci*. 2010 Aug 28;87(9-10):302-8.
- Garçon DP, Leone FA, Faleiros RO, Pinto MR, Moraes CM, Fabri LM, Antunes CD, McNamara JC. Osmotic and ionic regulation, and kinetic characteristics of a posterior gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae* on acclimation to salinity challenge. *Marine Biology* 2021. doi.org/10.1007/s00227-021-03882-3
- Garçon DP, Masui DC, Mantelatto FL, Furriel RP, McNamara JC, Leone FA. Hemolymph ionic regulation and adjustments in gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity during salinity acclimation in the swimming crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2009 Sep;154(1):44-55.
- Garçon DP, Masui DC, Mantelatto FL, McNamara JC, Furriel RP, Leone FA. K⁺ and NH₄⁽⁺⁾ modulate gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in the blue crab, *Callinectes ornatus*: fine tuning of ammonia excretion. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007 May;147(1):145-55.

Gatlin DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hard RW, Herman E, Hu G, Krogdahl Å, Nelson R, Overturf K, Rust M, Sealey W, Skonberg DJ, Souza E, Stone D, Wilson R, Wurtele E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, 2007 May;38(6):551-579.

Geering K. Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008 Sep;17(5):526-32.

Gomes Jr RS, de Lima JPV, Cavalli RO, Correia EDS. Acute toxicity of ammonia and nitrite to painted river prawn, *Macrobrachium carcinus*, larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 2016 Feb;47(Pt2):239-247.

Hans S, Quijada-Rodriguez AR, Allen GJP, Onken H, Treberg JR, Weihrauch D. Ammonia excretion and acid-base regulation in the American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *J Exp Biol*. 2018 Mar 21;221(Pt 6):jeb151894.

Hansen O. No evidence for a role in signal-transduction of Na⁺/K⁺-ATPase interaction with putative endogenous ouabain. *Eur J Biochem*. 2003 May;270(9):1916-9.

Hayd L, Anger K. Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. *Rev Biol Trop*. 2013 Mar;61(1):39-57.

Henry RP, Lucu C, Onken H, Weihrauch D. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front Physiol*. 2012 Nov 15;3:431.

Herbeck LS, Unger D, Wu Y, Jennerjahn TC. Effluent, nutrient and organic matter export from shrimp and fish ponds causing eutrophication in coastal and back-reef Waters of NE Hainan, tropical China. *Continental Shelf Research*. 2013 May;57:92-104.

Hong M, Chen L, Sun X, Gu S, Zhang L, Chen Y. Metabolic and immune responses in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles exposed to elevated ambient ammonia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2007 Apr;145(3):363-9.

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

Huang YH, Zhang M, Li YM, Wu DL, Liu ZQ, Jiang QC, Zhao YL. Effects of salinity acclimation on the growth performance, osmoregulation and energy metabolism of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Aquatic Res*. 2019 Feb;50:685-693.

Ituarte RB, Lignot JH, Charmantier G, Spivak E, Lorin-Nebel C. Immunolocalization and expression of Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾ -ATPase in embryos, early larval stages and adults of the freshwater shrimp *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Cell Tissue Res*. 2016 Jun;364(3):527-541.

Jalihah DR, Sankolli KN, Shenoy S. Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 1993 Jan;65(3):365-376.

Jalihah DR, Shenoy S, Sankolli KN. Adaptational significance of salinity tolerance in some freshwater prawns. *Proc. Symp. Ecol. Anim. Popul. Zool. Surv. India* 1981;2:175-187.

Jayasundara N, Towle DW, Weihrauch D, Spanings-Pierrot C. Gill-specific transcriptional regulation of Na⁺/K⁺ -ATPase alpha-subunit in the euryhaline shore crab *Pachygrapsus marmoratus*: sequence variants and promoter structure. *J Exp Biol*. 2007 Jun;210(Pt 12):2070-81.

Jia R, Cao LP, Du JL, Wang JH, Liu YJ, Jeney G, Xu P, Yin GJ. Effects of carbon tetrachloride on oxidative stress, inflammatory response and hepatocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat Toxicol*. 2014 Jul;152:11-9.

Jussila J, McBride S, Jago J, Evans LH. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George). *Aquaculture* 2001 Dec;199:185-193.

Kaiser GE, Wheaton FW. Nitrification filters for aquatic culture systems: state of the art. *Journal of the World Mariculture Society*. 1983 Mar;14(Pt1-4):302-324.

Kanai R, Ogawa H, Vilsen B, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of a Na⁺-bound Na⁺,K⁺-ATPase preceding the E1P state. *Nature*. 2013 Oct 10;502(7470):201-6.

Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:511-35.

Khalid M, Suliman R, Ahmed R, Salin H, Clarke RJ. The high and low affinity binding sites of digitalis glycosides to Na,K-ATPase. *Arab. J. Sci. Eng*. 2014 Nov;39:75-85.

Kinne O, Cultivation of marine organisms, water quality management and technology. In: O. Kinne (ED.) *Marine ecology*. Vol III, part 1. pp 79-300. Wiley-Interscience, New York.1976.

Kiris IG, Eroldoğan OT, Kir M, Kumlu M. Influence of neuropeptide Y (NPY) on food intake and growth of penaeid shrimps *Marsupenaeus japonicus* and *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae). *Comp Biochem*

Physiol A Mol Integr Physiol. 2004 Oct;139(2):239-44.

Kirschner LB. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol*. 2004 Apr;207(Pt 9):1439-52.

Knepper MA, Packer R, Good DW. Ammonium transport in the kidney. *Physiol Rev*. 1989 Jan;69(1):179-249.

Kormanik GA, Cameron JN. Ammonia excretion in the seawater blue crab (*Callinectes sapidus*) occurs by diffusion, and not Na⁺/NH₄⁺ exchange. *J. Comp. Physiol B*. 1981 Dec;141:457-462.

Kozák P, Policar T, Fedotov VP, Kuznetsova TV, Buřič M, Kouba A, Kuklina I, Kholodkevich SV. Stress reaction in crayfish: chlorides help to withstand stress in high nitrite concentration conditions — preliminary study. *Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst*. 2011.

Kubitza F., Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. ESALQ/USP, Jundiaí, Brasil, 2003.

- Kutty MN, Herman F, Le Menn H. Culture of other prawn species. In: M.B. New, W.C. Valenti (eds.) *Freshwater Prawn Culture, The Farming of *Macrobrachium rosenbergii**. pp. 393-410. Blackwell Science, Oxford. 2000.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- Larsen EH, Deaton LE, Onken H, O'Donnell M, Grosell M, Dantzler WH, Weihrauch D. Osmoregulation and excretion. *Compr Physiol*. 2014 Apr;4(2):405-573.
- Laursen M, Gregersen JL, Yatime L, Nissen P, Fedosova NU. Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺,K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Feb 10;112(6):1755-60.
- Laursen M, Yatime L, Nissen P, Fedosova NU. Crystal structure of the high-affinity Na⁺K⁺-ATPase-ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 2;110(27):10958-63.
- Lecuona E, Sun H, Chen J, Trejo HE, Baker MA, Sznajder JI. Protein kinase A-1 α regulates Na,K-ATPase endocytosis in alveolar epithelial cells exposed to high CO₂ concentrations. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 May;48(5):626-34.
- Leone FA, Baranauskas JA, Furriel RP, Borin IA, Sigraf W. An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. *Biochem Mol Biol Educ*. 2005 Nov;33(6):399-403.
- Leone FA, Bezerra TM, Garçon DP, Lucena MN, Pinto MR, Fontes CF, McNamara JC. Modulation by K⁺ Plus NH₄⁺ of microsomal (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in selected ontogenetic stages of the diadromous river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *PLoS One*. 2014 Feb 21;9(2):e89625.
- Leone FA, Garçon DP, Lucena MN, Faleiros RO, Azevedo SV, Pinto MR, McNamara JC. Gill-specific (Na⁺, K⁺)-ATPase activity and α -subunit mRNA expression during low-

salinity acclimation of the ornate blue crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2015 Aug;186:59-67.

Leone FA, Lucena MN, Fabri LM, Garçon DP, Fontes CFL, Faleiros RO, Moraes CM, McNamara JC. Osmotic and ionic regulation, and modulation by protein kinases, FXD2 peptide and ATP of gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity, in the swamp ghost crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2020 Dec;250:110507.

Leone FA, Lucena MN, Garçon DP, Pinto MR, McNamara JC Gill ion transport ATPases and ammonia excretion in aquatic crustaceans. In: Weihrauch D, O'Donnell MJ (eds) *Acid-base balance and nitrogen excretion in invertebrates. Mechanisms and strategies in various invertebrate groups with considerations of challenges caused by ocean acidification.* Springer, New York, pp 61-107, 2017. doi: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-39617-0_3

Leone FA, Masui DC, de Souza Bezerra TM, Garçon DP, Valenti WC, Augusto AS, McNamara JC. Kinetic analysis of gill (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in selected ontogenetic stages of the Amazon River shrimp, *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae): interactions at ATP- and cation-binding sites. *J Membr Biol.* 2012 Apr;245(4):201-15.

Liang C, Liu J, Cao F, Li Z, Chen T. Transcriptomic analyses of the acute ammonia stress response in the hepatopancreas of the kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Aquaculture* 2019 Aug;513:734328.

Lin Y, Chen J. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2001 Apr 30;259(1):109-119.

Liu CH, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2004 Mar;16(3):321-34.

Liu M, Pan L, Li L, Zheng D. Molecular cloning, characterization and recombinant expression of crustacean hyperglycemic hormone in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Peptides.* 2014 Mar;53:115-24.

- Lovett DL, Verzi MP, Burgents JE, Tanner CA, Glomski K, Lee JJ, Towle DW. Expression profiles of Na⁺,K⁺-ATPase during acute and chronic hypo-osmotic stress in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biol Bull*. 2006 Aug;211(1):58-65.
- Lu X, Luan S, Cao B, Meng X, Sui J, Dai P, Luo K, Shi X, Hao D, Han G, Kong J. Estimation of genetic parameters and genotype-by-environment interactions related to acute ammonia stress in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles at two different salinity levels. *PLoS One*. 2017 Mar 22;12(3):e0173835.
- Lucena MN, Garçon DP, Fontes CF, McNamara JC, Leone FA. Polyamines regulate phosphorylation-dephosphorylation kinetics in a crustacean gill (Na⁺, K⁺)-ATPase. *Mol Cell Biochem*. 2017b May;429(1-2):187-198.
- Lucena MN, Garçon DP, Fontes CFL, Fabri LM, Moraes CM, McNamara JC, Leone FA. Dopamine binding directly up-regulates (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in the gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2019 Jul;233:39-47.
- Lucena MN, McNamara JC, Leone FA. Gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the Amazon River shrimp, *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae): effect of exogenous biogenic amines on enzyme activity in juveniles and adults. *Hydrobiol*. 2017a Abr;789:59-76.
- Lucena MN, Pinto MR, Garçon DP, McNamara JC, Leone FA. A kinetic characterization of the gill V(H⁺)-ATPase in juvenile and adult *Macrobrachium amazonicum*, a diadromous palaemonid shrimp. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2015 Mar;181:15-25.
- Lucu C, Devescovi M, Siebers D. Do amiloride and ouabain affect ammonia fluxes in perfused *Carcinus* gill epithelia? *J Exp Zool*. 1989 Jan;249(1):1-5.
- Lucu C, Devescovi M, Skaramuca B, Kozul V V. Gill Na,K-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers. Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation. *J Exp Mar Biol Ecol*. 2000 Apr 5;246(2):163-178.
- Lucu C, Flik G. Na⁺-K⁺-ATPase and Na⁺/Ca²⁺ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. *Am J Physiol*. 1999 Feb;276(2):R490-9.
- Lucu C, Towle DW. Na⁽⁺⁾+K⁽⁺⁾-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003 Jun;135(2):195-214.

Luquet CM, Weihrauch D, Senek M, Towle DW. Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *J Exp Biol*. 2005 Oct;208(Pt 19):3627-36.

Maciel CR, Valenti WC. Biology, fisheries, and aquaculture of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. *Nauplius* 2009 Nov;17(2):61-79.

Magalhães C, Bueno SLS, Bond-Buckup G, Valenti WC, Silva HLM, Kiyohara F, Mossolin EC, Rocha SS. Exotic species of freshwater decapod crustaceans in the state of São Paulo, Brazil, records and possible causes of their introduction. *Biodiv. Conserv.* 2005 Feb;14:1929-1945.

Maningas MB, Kondo H, Hirono I, Saito-Taki T, Aoki T. Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity. *Mol Immunol*. 2008 Mar;45(5):1269-75.

Manush SM, Pal AK, Chatterjee N, Das T, Mukherjee SC. Thermal tolerance and oxygen consumption of *Macrobrachium rosenbergii* acclimated to three temperatures. *Journal of Thermal Biology*. 2004 Nov;29(Pt1):15-19.

Maraschi AC, Freire CA, Prodocimo V. Immunocytochemical localization of V-H(+) - ATPase, Na(+) /K(+) -ATPase, and carbonic anhydrase in gill lamellae of adult freshwater euryhaline shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae). *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*. 2015 Aug;323(7):414-21.

Marini AM, Matassi G, Raynal V, André B, Cartron JP, Chérif-Zahar B. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat Genet*. 2000 Nov;26(3):341-4.

Marks MJ, Seeds NW. A heterogeneous ouabain-ATPase interaction in mouse brain. *Life Sci*. 1978 Dec 31;23(27-28):2735-44.

Marques HLA, Lombardi JV, Book MV. Stocking densities for nursery phase culture of the freshwater prawn

Macrobrachium rosenbergii in cages. *Aquaculture*. 2000 Dec;187(Pt1-2):127-132.

Marques HLA, Moraes-Valenti PMC. Status of freshwater prawn farming in Brazil. *Aquac. Res.* 2012;43: 984-992.

Martin DW. Structure-function relationships in the Na^+, K^+ -pump. *Semin Nephrol.* 2005 Sep;25(5):282-91.

Martín FE, Federico PO. Toxicidad de los compuestos del nitrógeno em camarones. In: Federico, P.O. (Ed.), *Camaronicultura y Medio Ambiente*. El Colegio de Sinaloa, Unam, México, 224-242. 2001.

Martin M, Fehsenfeld S, Sourial MM, Weihrauch D. Effects of high environmental ammonia on branchial ammonia excretion rates and tissue Rh-protein mRNA expression levels in seawater acclimated Dungeness crab *Metacarcinus magister*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2011 Oct;160(2):267-77.

Masui DC, Furriel RP, McNamara JC, Mantelatto FL, Leone FA. Modulation by ammonium ions of gill microsomal $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2002 Aug;132(4):471-82.

Masui DC, Furriel RP, Silva EC, Mantelatto FL, McNamara JC, Barrabin H, Scofano HM, Fontes CF, Leone FA. Gill microsomal $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Dec;37(12):2521-35.

McNamara JC, Faria SC. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *J Comp Physiol B.* 2012 Dec;182(8):997-1014.

McNamara JC, Freire CA, Torres AH, Faria SC. The conquest of freshwater by the palaemonid shrimps, an evolutionary history scripted in the osmoregulatory epithelia of the gills and antennal glands. *Biol. J. Linn. Soc.* 2015 Oct;114:673-688.

McNamara JC, Moreira GS, Moreira PS. The effect of salinity on respiratory metabolism, survival and moulting in the first zoea of *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Crustacea, Palaemonidae). *Hydrobiol.* 1983 July;101:239-242.

McNamara JC, Moreira GS, Souza SCR. The effect of salinity on respiratory metabolism in selected ontogenetic stages of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 1986 June;83(2):359-363.

McNamara JC, Rosa JC, Greene LJ, Augusto A. Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. *Mar. Freshwater Behav. Physiol.* 2004 Sept;37(Pt3):193-208.

McNamara JC, Torres AH. Ultracytochemical location of Na(+)/K(+)-atpase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *J Exp Zool.* 1999 Nov 1;284(6):617-28.

Meireles AL, Valenti WC, Mantelatto FL. Reproductive variability of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Caridea, Palaemonidae), influence of life cycle on egg production. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 2013 Oct;41(4):718-731.

Miranda Filho K, Wasielesky Junior WB, Maçada A. Efeito da amônia e nitrito no crescimento da tainha *Mugil platanus* (Pisces, Mugilidae). *Rev. Brasil. Biol.* 1995;55(Pt1):45-50.

Miron DDS, Moraes B, Becker AG, Crestani M, Spanevello R, Loro VL, Baldisserotto B. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture* 2008 Feb;277(3-4):192-196.

Montoya JV. Freshwater shrimps of the genus *Macrobrachium* associated with roots of *Eichhornia crassipes* (Water Hyacinth) in the Orinoco Delta (Venezuela). *Caribbean J. Sci.* 2003;39:155-159.

Moraes CM, Lucena MN, Garçon DP, Pinto MR, Fabri LM, Faleiros RO, Fontes CFL, McNamara JC, Leone FA. Biochemical Characterization and Allosteric Modulation by Magnesium of (Na⁺, K⁺)-ATPase Activity in the Gills of the Red Mangrove Crab *Goniopsis cruentata* (Brachyura, Grapsidae). *J Membr Biol.* 2020 Jun;253(3):229-245.

Moraes-Riodades PMC, Valenti WC. Freshwater prawn farming in Brazilian Amazonia shows potential for economic social development. *Global Aquacult. Advoc.* 2001 Oct4:73-74.
Moraes-Riodades PMC, Valenti WC. Morphotypes in male Amazon River Prawns, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquacult.* 2004 Feb;236:297-307.

Moraes-Riodades PMC, Valenti WC, Peralta ASL, Amorim MDL. Carcinicultura de água doce no Estado do Pará: situação atual e perspectivas. *Anais Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, 9 e Congresso Latino-Americano de Engenharia de Pesca, 1*, Recife 1999:598-604.

Moraes-Valenti P, Valenti WC. Culture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: M.B. New, W.C. Valenti, J.H. Tidwell, L.R. D'Abramo, M.N. Kutty (Eds.) *Freshwater Prawns; Biology and Farming*. pp. 485-501. Wiley-Blackwell, Oxford.2010.

Moraes-Valenti P, Valenti WC. Culture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. Cap 22. 485- 530. In: New MB, Valenti WC, Tidwell JH, D'Abramo LR. 2009.

Moraes-Valenti PMC, Moraes PA, Preto BL, Valenti WC. Effect of density on population development in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquat. Biol.* 2010 June;9:291-301.

Moreira GS, McNamara JC, Moreira PS. The effect of salinity on the upper thermal limits of survival and metamorphosis during larval development in *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*. 1986 June;50(3):231-238.

Moreira LC, Collart OO. Diel vertical migration of the prawn larvae of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) in a central Amazonian floodplain lake, Careiro Island, Brazil. *Amazoniana* 1993;12: 385-398.

Morris S. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *J Exp Biol*. 2001 Mar;204(Pt 5):979-89.

Morth JP, Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Andersen JP, Vilsen B, Palmgren MG, Nissen P. A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jan;12(1):60-70.

Morth JP, Pedersen BP, Toustrup-Jensen MS, Sørensen TL, Petersen J, Andersen JP, Vilsen B, Nissen P. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*. 2007 Dec 13;450(7172):1043-9.

Myrick CA. Ecological impacts of escaped organisms. *Aquaculture and the Environment in the United States*. US Aquaculture Society, A Chapter of the World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, p. 225-245, 2002.

Nakada T, Westhoff CM, Yamaguchi Y, Hyodo S, Li X, Muro T, Kato A, Nakamura N, Hirose S. Rhesus glycoprotein p2 (Rhp2) is a novel member of the Rh family of ammonia transporters highly expressed in shark kidney. *J Biol Chem*. 2010 Jan 22;285(4):2653-64.

Naqvi AA, Adhikari S, Pillai BR, Sarangi N. Effect of ammonia-N on growth and feeding of juvenile *Macrobrachium rosenbergii* (De-Man). *Aquacult. Res.*, 2007;38:847-851.

New MB. *Farming Freshwater Prawns: A Manual for the Culture of the Giant River Prawn (Macrobrachium rosenbergii)*. FAO Fisheries Technical Paper, Rome, p. 212. 2002.

Nyblom M, Poulsen H, Gourdon P, Reinhard L, Andersson M, Lindahl E, Fedosova N, Nissen P. Crystal structure of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase in the Na⁽⁺⁾-bound state. *Science*. 2013 Oct 4;342(6154):123-7.

Odinetz-Collart O, Rabelo H. Variation in egg size of the fresh-water prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae). *J. Crust. Biol.* 1996;16:684-688.

Ogawa H, Shinoda T, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):13742-7.

Onken H, McNamara JC. Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. *J Exp Biol*. 2002 Jan;205(Pt 2):167-75.

Onken H, Riestenpatt S. NaCl absorption across split gill lamellae of hyper regulating crabs, transport mechanisms and their regulation. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 1998 Jan;119:883-893.

Ostrensky A, Wasielesky WJ. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture* 1995 Oct;132:339-347.

Oubaassine R, Weckering M, Kessler L, Breidert M, Roegel JC, Eftekhari P. Insulin interacts directly with Na⁺/K⁺ATPase and protects from digoxin toxicity. *Toxicology*. 2012 Sep 4;299(1):1-9.

Palacios E, Racotta IS. Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. *Aquacult*. 2007;268:123-135.

Palmgren MG, Nissen P. P-type ATPases. *Annu Rev Biophys*. 2011;40:243-66.

Pan L, Si L, Liu S, Liu M, Wang G. Levels of metabolic enzymes and nitrogenous compounds in the swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N. *J. Ocean Univ. China* 2018 Abril;17(4):957-966.

Pantaleão JAF, Carvalho-Batista A, Teodoro SSA, Costa RC. The influence of environmental variables in the reproductive performance of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae) females in a continental population. *Anais Acad. Bras. Ciências* 2018;90:1445-1458.

Pedersen PL. Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2007 Dec;39(5-6):349-55.

Peltier WH, Weber CL. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-85/013, third ed. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, p. 216.1985.

Péqueux A, Gilles R. Na⁺ fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *J Exp Biol.* 1981 Aug;92:173-186.

Péqueux A. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 1995 Feb;15(Pt1):1-60.

Perazzolo LM, Lorenzini DM, Daffre S, Barracco MA. Purification and partial characterization of the plasma clotting protein from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2005 Nov;142(3):302-7.

Pezzato LE, Miranda EC, Barros MM, Pinto LGQ, Furuya WM, Pezzato AC. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia.* 2002 Dec;31(4):1595-1604.

Phakdeekitcharoen B, Kittikanokrat W, Kijkunasathian C, Chatsudthipong V. Aldosterone increases Na⁺ -K⁺ -ATPase activity in skeletal muscle of patients with Conn's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011 Feb;74(2):152-9.

Phakdeekitcharoen B, Phudhichareonrat S, Pookarnjanamorakot C, Kijkunasathian C, Tubtong N, Kittikanokrat W, Radinahamed P. Thyroid hormone increases mRNA and protein expression of Na⁺-K⁺-ATPase alpha2 and beta1 subunits in human skeletal muscles. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jan;92(1):353-8.

Pileggi LG, Mantelatto FLM. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. *Invert. Sys.* 2010 April;24:194-208.

Pinto EMO. camarão canela, *Macrobrachium amazonicum* (Heller), em açudes públicos do Nordeste do Brasil administrados pelo Departamento Nacional de Obras contra as Secas. (Monografia de Graduação, Universidade Federal do Ceará).1977.

Pinto MR, Lucena MN, Faleiros RO, Almeida EA, McNamara JC, Leone FA. Effects of ammonia stress in the Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Aquat Toxicol.* 2016 Jan;170:13-23.

Pirkmajer S, Chibalin AV. Hormonal regulation of Na⁺-K⁺-ATPase from the evolutionary perspective. *Curr Top Membr.* 2019;83:315-351.

Pirkmajer S, Chibalin AV. Na,K-ATPase regulation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016 Jul 1;311(1):E1-E31.

Pivovarov AS, Calahorro F, Walker RJ. Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invert Neurosci.* 2018 Nov 28;19(1):1.

Ponce-Palafox J, Martinez-Palacios CA, Ross LG. The effect of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus* *Ôannamei*, Boone, 1931. *Aquacul.* 1997 May;157:107-115.

Post RL, Hegyvary C, Kume S. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem.* 1972 Oct 25;247(20):6530-40.

Poulsen H, Morth P, Egebjerg J, Nissen P. Phosphorylation of the Na⁺,K⁺-ATPase and the H⁺,K⁺-ATPase. *FEBS Lett.* 2010 Jun 18;584(12):2589-95.

Pressley TA, Graves JS, Krall AR. Amiloride-sensitive ammonium and sodium ion transport in the blue crab. *Am J Physiol.* 1981 Nov;241(5):R370-8.

Racotta IS, Hernández-Herrera R. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2000 Apr;125(4):437-43.

Rahi ML, Amin S, Mather PB, Hurwood DA. Candidate genes that have facilitated freshwater adaptation by palaemonid prawns in the genus *Macrobrachium*: identification and expression validation in a model species (*M. koombooloomba*). *PeerJ.* 2017 Feb 8;5:e2977.

Randall D, Burggren W, French K. *Animal Physiology: Mechanisms and adaptations.* 4th Ed. (pp 727) WH Freeman, New York. 2000

Read SM, Northcote DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem.* 1981 Sep 1;116(1):53-64.

Ren Q, Pan L, Zhao Q, Si L. Ammonia and urea excretion in the swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2015 Sep;187:48-54.

Ren R, Pan L. Digital gene expression analysis in the gills of the swimming crab (*Portunus trituberculatus*) exposed to elevated ambient ammonia-N. *Aquaculture* 2014 Aug;434:108-114

Rhodes RJ. Economics and Business Management. In: New MB, Valenti WC. (ED.).

Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Oxford: Blackwell Science. p. 369-392. 2000.

Rocha SS, Silva RLS, Santos JL, Oliveira G. Length–weight relationship and condition factor of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae) from a reservoir in Bahia, Brazil. *Nauplius* 2015 July;23(2):146-158.

Romano N, Zeng C. Importance of balanced Na⁺/K⁺ ratios in seawater for early *Portunus pelagicus* juveniles to cope with elevated ammonia-N and differences between in vitro and in vivo gill Na⁺/K⁺- ATPase responses. *Aquacul.* 2011 May;318:154–161.

Romano N, Zeng C. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated histological gill alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquacul.* 2007 Jan;266:246-254.

Romano N, Zeng C. Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquacul.* 2012 Dec;334–337:12-23.

Romano N, Zeng C. Survival, osmoregulation and ammonia-N excretion of blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, juveniles exposed to different ammonia-N and salinity combinations. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2010 Mar;151(2):222-8.

Romano N, Zeng C. Toxic Effects of Ammonia, Nitrite, and Nitrate to Decapod Crustaceans: A Review on Factors Influencing their Toxicity, Physiological Consequences, and Coping Mechanisms *Reviews in Fisheries Scienc.* 2013 May;21(1):1-21.

Rovero EA, Lobão VL, Horikawa MT. Arraçoamento intensivo de pós-larvas de *Macrobrachium amazonicum* Heller e *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Decapoda, Palaemonidae) até a fase juvenil. *Boletim do Instituto de Pesca.* 1990;17:91-98.

Russo RC, Thurston RV. Toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to fishes. In: BRUNE DE, TOMASSO JR (Eds.). *Aquaculture and Water Quality*, the World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 58–89, 1991.

Sáez AG, Lozano E, Zaldívar-Riverón A. Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. *Genetica*. 2009 Jul;136(3):479-90.

Salyer SA, Parks J, Barati MT, Lederer ED, Clark BJ, Klein JD, Khundmiri SJ. Aldosterone regulates Na(+), K(+) ATPase activity in human renal proximal tubule cells through mineralocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1833(10):2143-52.

Sampaio CM, Silva RR, Santos JA, Sales SP. Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). *Braz J Biol*. 2007 Aug;67(3):551-9.

Santos LC, Belli NM, Augusto A, Masui DC, Leone FA, McNamara JC, Furriel RP. Gill (Na⁺,K⁺)-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps: species-specific kinetic characteristics and alpha-subunit expression. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007 Sep;148(1):178-88.

Scheiner-Bobis G. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur J Biochem*. 2002 May;269(10):2424-33.

Schubart CD, Diesel R. Osmoregulatory capacities and penetration into terrestrial habitats: a comparative study of Jamaican crabs of the genus *Armases* Abele, 199 (Brachyura: Grapsidae: Sesarminae). *Bull. Mar. Sci*. 1998 Abril;6(3):743-752.

Shinoda T, Ogawa H, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature*. 2009 May 21;459(7245):446-50.

Short JW. A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Hydrobiol*. 2004 Feb;525:1-100.

Silva EC, Masui DC, Furriel RP, McNamara JC, Barrabin H, Scofano HM, Perales J, Teixeira-Ferreira A, Leone FA, Fontes CF. Identification of a crab gill FX_{YD2} protein and

regulation of crab microsomal Na,K-ATPase activity by mammalian FXYD2 peptide. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Nov;1818(11):2588-97.

Skou JC. Further investigations on a $Mg^{+++}Na^{+}$ -activated adenosin triphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1960 Jan;42:6-23.

Slingerland M, Cerella C, Guchelaar HJ, Diederich M, Gelderblom H. Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials. *Invest New Drugs*. 2013 Aug;31(4):1087-94.

Soeiro RKS, Rocha CP, Maciel M, Abrunhosa FA, Maciel CR. Relação entre a origem costeira de *Macrobrachium amazonicum* e o nível de salinidade na larvicultura. *Bol. Inst. Pesca* 2016 Aug;42(3):691-703.

Solorzano L. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.* 1969 Sept;14:799-801.

Sprague JB. Measurement of pollutant toxicity to fish-III: sublethal effects and "safe" concentrations. *Water Res.* 1971 Jan;5:245-266.

Stormer J, Jensen FB, Rankin JC. Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects on ionic balance. *Canada Journal Fisheries Aquatic Science* 1996 Mar;53:1943-1950.

Tacon AGJ, Metian M. Global overview on the use of fishmeal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquacul.* 2009 Aug;285(1-4):146-158.

Taylor HH, Taylor EW. Microscopic anatomy of invertebrates. In: Harrison FW, Humas AG. (Org.) *Decapod Crustacea*. Vol. 10, (pp. 203-293). Wiley-Liss, New York. 1992.

Thabet R, Ayadi H, Koken M, Leignel V. Homeostatic responses of crustaceans to salinity changes. *Hydrobiol.* 2017;799:1-20.

Therien AG, Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Sep;279(3):C541-66.

Thurston RV, Russo RC, Phillips GR. Acute toxicity of ammonia to Fathead minnows. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1986 June;112:705-711.

Timmons MB, Ebeling JM, Weathon FW, Summerfelt ST, Vinci BJ. *Recirculating Aquaculture System*. second ed. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, p. 769. 2002.

Torloni CEC, Santos JJ, Carvalho JR, Corrêa ARA. A pescada-do-piauí *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Osteichthyes, Perciformes) nos reservatórios da Companhia Energética de São Paulo - CESP. *Série Pesquisa e Desenvolvimento (CESP, São Paulo)* 1993;84:1-23.

Torres, A. H. Jr. (2006). Um estudo eletrofisiológico e ultraestrutural do transporte iônico transepitelial em camarões e caranguejos (Crustacea, Decapoda). (Tese de doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo). Recuperado de www.teses.usp.br.

Toustrup-Jensen MS, Holm R, Einholm AP, Schack VR, Morth JP, Nissen P, Andersen JP, Vilsen B. The C terminus of Na⁺,K⁺-ATPase controls Na⁺ affinity on both sides of the membrane through Arg935. *J Biol Chem*. 2009 Jul 10;284(28):18715-25.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.

Towle DW, Henry RP, Terwilliger NB. Microarray-detected changes in gene expression in gills of green crabs (*Carcinus maenas*) upon dilution of environmental salinity. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 2011 Jun;6(2):115-25.

Towle DW, Paulsen RS, Weihrauch D, Kordylewski M, Salvador C, Lignot JH, Spanings-Pierrot C. Na(+)+K(+)-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of alpha-subunit mRNA and protein. *J Exp Biol.* 2001 Nov;204(Pt 22):4005-12.

Towle DW, Weihrauch D. Osmoregulation by gills of euryhaline crabs, molecular analysis of transporters. *Am. Zool.* 2001 April;41:770-780.

Tsai JR, Lin HC. V-type H⁺-ATPase and Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *J Exp Biol.* 2007 Feb;210(Pt 4):620-7.

Valencia-Castañeda G, Frías-Espericueta MG, Vanegas-Pérez RC, Pérez-Ramírez JA, Chávez-Sánchez MC, Páez-Osuna F. Acute Toxicity of Ammonia, Nitrite and Nitrate to Shrimp *Litopenaeus vannamei* Postlarvae in Low-Salinity Water. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2018 Aug;101(2):229-234.

Valenti CW, Daniels WH. Recirculation hatchery systems and management In: New MB, Valenti WC. (Ed.) *Freshwater Prawn Culture: The farming of *Macrobrachium rosenbergii**. Oxford, Blackwell Science. p. 69-90, 2000.

Valenti CW, Franceschini-Vicentini BI, Pezzato LE. The potential for *Macrobrachium amazonicum* culture. *World Aquaculture*, p. 19-23, 2003.

Valenti WC, Barros HP, Moraes-Valenti P, Bueno GW, Cavalli RO. Aquaculture in Brazil, past, present and future. *Aquacult. Reports* 2021 Jan;19:100611.

Valenti WC. Carcinicultura de água doce: tecnologia para produção de camarões. Brasília: IBAMA. p.268. 1998.

Valenti WC. Current status of freshwater prawn culture in Brazil. In: C.M. Nair, D.D. Nambudiri, S. Jose, T.M. Sankaran, K.V. Jayachandran, K.R. Salin (Eds.) *Freshwater prawns, advances in biology, aquaculture and marketing*. pp. 105-110. Allied Publishers, New Delhi.2007.

Valle BCS, Dantas Junior EM, Silva JFX, Bezerra RS, Correia ES, Peixoto SMR, Soares RB. Replacement of fish meal by fish protein hydrolysate and biofloc in the the diets of *Litopenaeus vannamei* post larvae. *Aquaculture Nutrition*. 2015 Oct;21(1):105-112.

Vasquez OE, Rouse DB, Rogers WA. Growth response of *Macrobrachium rosenbergii* to different levels of hardness. *J. World Aquacult. Soc.* 1989;20:90-92.

Vera-Silva AL, Carvalho FL, Mantelatto FL. Distribution and genetic differentiation of *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877) (Natantia: Palaemonidae) in Brazil reveal evidence of Non-natural introduction and cryptic allopatric speciation. *J. Crust. Biol.* 2016 Feb;36:373-383.

Vergamini FG, Pileggi LG, Mantelatto FL. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contrib. Zool.* 2011 Feb;80:67-8.

Wang AL, Wang WN, Wang Y, Shang LX, Liu Y, Sun RY. Effect of dietary vitamin C supplementation on the oxygen consumption, ammonia-N excretion and Na⁺/K⁺ ATPase of *Macrobrachium nipponense* exposed to ambient ammonia. *Aquacul.* 2003Sept;220:833-841.

Wang F, Liang Q, Liu C, Dong W, Ou M, Li Z, Liu Y. Tuberos sclerosis complex 1 (PvTSC1) participates in ammonia nitrogen induced oxidative stress in *Penaeus vannamei* by regulating autophagy. *Aquacul.* 2021 Jan;533:736107.

Weihrauch D, Becker W, Postel U, Riestenpatt S, Siebers D. Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. *J. Comp. Physiol. B.* 1998 Mar;68:364-376.

Weihrauch D, Donini A, O'Donnell MJ. Ammonia transport by terrestrial and aquatic insects. *J Insect Physiol.* 2012 Apr;58(4):473-87.

Weihrauch D, Morris S, Towle DW. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J Exp Biol.* 2004 Dec;207(Pt 26):4491-504.

Weihrauch D, O'Donnell MJ. Links between Osmoregulation and Nitrogen-Excretion in Insects and Crustaceans. *Integr Comp Biol.* 2015 Nov;55(5):816-29.

Weihrauch D, Ziegler A, Siebers D, Towle DW. 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.* 2002 Sep;205(Pt 18):2765-75.

Wengert M, Ribeiro MC, Abreu TP, Coutinho-Silva R, Leão-Ferreira LR, Pinheiro AA, Caruso-Neves C. Protein kinase C-mediated ATP stimulation of Na(+)-ATPase activity in LLC-PK1 cells involves a P2Y2 and/or P2Y4 receptor. *Arch Biochem Biophys.* 2013 Jul 15;535(2):136-42.

Yatime L, Laursen M, Morth JP, Esmann M, Nissen P, Fedosova NU. Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na⁺,K⁺-ATPase. *J Struct Biol.* 2011 May;174(2):296-306.

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

Yue F, Pan L, Xie P, Zheng D, Li J. Immune responses and expression of immune-related genes in swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2010 Nov;157(3):246-51.

Zanders IP, Rodriguez JM. Effects of temperature and salinity stress on osmoionic regulation in adults and on oxygen-consumption in larvae and adults of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp Biochem Physiol A.* 1992 Jan;101:505-509.

Zhang Y, Ye C, Wang A, Zhu X, Chen C, Xian J, Sun Z. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in giant freshwater pawn (*Macrobrachium rosenbergii*): effects on the

oxidative stress, antioxidant enzymatic activities and apoptosis in haemocytes. *Ecotoxicology*. 2015 Oct;24(7-8):1601-10.

Zhao M, You D, Li S, Zhang Y, Aweya JJ. Effects of ammonia on shrimp physiology and immunity: a review. *Reviews in Aquacult*. 2020 Mar;12:2194–2211.

Zhou L, Boyd CE Comparison of Nessler, phenate, salicylate and ion selective electrode procedures for determination of total ammonia nitrogen in aquaculture. *Aquacult*. 2016 Aug ;450:187-193.