



Universidade Federal do Rio Grande – FURG  
Instituto de Ciências Biológicas - ICB  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas:  
Fisiologia Animal Comparada – PPGCF-FAC



**Caracterização transcricional dos genes *CTR1* e *ATP7B* no peixe  
*Poecilia vivipara*: efeitos do cobre e da salinidade**

Dissertação defendida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Biol. Evelise Sampaio da Silva  
Orientador: Adalto Bianchini  
Co-orientador: Juliano Zanette

Fevereiro, 2013.

## AGRADECIMENTOS

Com o final dessa etapa chega o momento de agradecer a todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço a FURG, a CAPES, ao CNPq e ao INCT - Toxicologia Aquática pela oportunidade de realização desse curso de mestrado e pelo apoio financeiro. Ao meu orientador, professor Adalto Bianchini por ter me recebido tão bem desde a primeira conversa. Obrigada pela confiança, compreensão e pela ajuda no decorrer desse trabalho. Ao meu co-orientador, Juliano Zanette pelo constante estímulo, pela paciência, parceria e ajuda fundamental na elaboração e execução desse projeto.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Animal Comparada, agradeço os ensinamentos e o auxílio nos momentos de dúvida. Ao Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Loraine, Cássia e Isabel, obrigada pela agradável convivência e apoio nos momentos difíceis. Aos colegas, orientados do professor Adalto, agradeço pelo aprendizado que me proporcionaram em cada reunião e ajuda na execução desse trabalho. Obrigada também a todos colegas e estagiários, orientados do professor Juliano, que participaram das coletas na Praia do Cassino.

Não poderia deixar de agradecer aos meus queridos colegas da “*melhor sala da Fisio, a sala 3*”: Flávio, Lygia, Indianara, Roberta Klein, Martina, Roberta Socoowski, Márcia, Alessandra, Alzira, Ana Laura, Josencler, Ana Cristina e Ana Luiza e todos os que passaram pela sala durante esses 2 anos, incluindo os aleatórios! Sem vocês não teria sido tão divertido!

À querida Ana Laura, minha dupla desde o primeiro dia! Sentirei muita saudade das nossas conversas, das coletas e das risadas.

Agradeço o apoio, nos momentos difíceis dessa trajetória, e a amizade sincera dos melhores presentes que a Biologia me deu, Laura e Otávio. Por fim, agradeço à

minha família pela paciência, compreensão e apoio sempre. Amo vocês! Além de agradecer, dedico este trabalho ao meu pai Fernando Falcão, meu maior exemplo de vida e de superação.

Muito Obrigada!

## SUMÁRIO

1. Resumo.....	4
2. Abstract.....	5
3. Introdução Geral.....	6
3.1 Cobre.....	6
3.2 Mecanismos celulares de transporte de cobre.....	8
3.2.1 CTR1.....	9
3.2.2 Cu-ATPases.....	11
3.3 Modelo experimental: <i>Poecilia vivipara</i> .....	13
4. Objetivos.....	14
4.1 Objetivo Geral.....	14
4.2 Objetivos Específicos.....	15
5. Artigo.....	15
6. Discussão Geral.....	49
7. Conclusão Geral.....	52
8. Perspectivas.....	52
9. Referências Bibliográficas.....	53

## 1. RESUMO

Em peixes, o cobre (Cu) é absorvido a partir da água, via branquial, e pela ingestão de água e alimento, via gastrintestinal. Para evitar reações não específicas prejudiciais e suprir proteínas dependentes de Cu, existem transportadores específicos, como as proteínas de absorção de alta afinidade ao Cu (CTR1) e as Cu-ATPases (ATP7), que auxiliam na translocação intracelular do metal. No presente estudo, os genes *CTR1* e *ATP7B* foram identificados em *Poecilia vivipara* e os seus transcritos foram quantificados por RT-qPCR nas brânquias, no fígado e no intestino de guarús expostos (96 h) ao Cu (0, 5, 9 e 20 µg/L) em água doce e salgada (salinidade 24). Foram identificadas novas sequências nucleotídicas dos genes *CTR1* (1560 pb, completa) e *ATP7B* (617 pb, parcial), as quais tiveram altos valores de identidade com as descritas para *Fundulus heteroclitus* (*CTR1*=81%) e *Sparus aurata* (*ATP7B*=81%). A análise por RT-qPCR indicou níveis de transcrição para *CTR1* e *ATP7B* em todos os tecidos analisados. Em guarús na água doce, a maior expressão da *CTR1* e da *ATP7B* se deu no fígado. Em guarús na água salgada, a maior expressão da *CTR1* ocorreu no intestino, enquanto a da *ATP7B* se deu no fígado e intestino. Na água doce, a exposição ao Cu aumentou o conteúdo branquial e hepático de Cu, diminuiu os transcritos de *CTR1* e *ATP7B* nas brânquias e aumentou os transcritos destes genes no fígado, sem alterar o conteúdo corporal de Cu. Na água salgada, a exposição ao Cu aumentou o conteúdo de Cu e diminuiu o transcrito de *ATP7B* no intestino, sem alterar o conteúdo corporal de Cu nos *P. vivipara*. Estes resultados indicam que a homeostasia do Cu em *P. vivipara* envolve a redução da expressão do *CTR1* e *ATP7B* nas brânquias (água doce) e intestino (água salgada) para limitar a absorção do Cu e o aumento da expressão destes genes no fígado (água doce) para facilitar o armazenamento e desintoxicação do Cu.

**Palavras-chave:** ATP7B, cobre, CTR1, guarú, *Poecilia vivipara*, salinidade

## 2. ABSTRACT

In fish, copper (Cu) is absorbed directly from the water, via gills, and through the ingestion of water and food, via gastrointestinal. To avoid non-specific and harmful reactions and supply the Cu-dependent proteins, there are specific protein transporters involved in Cu metabolism, such as the high-affinity copper transporter (CTR1) and Cu-ATPases (ATP7). They play an important role in the intracellular metal translocation. In the present study, *CTR1* and *ATP7B* were identified in the guppy *Poecilia vivipara*. Transcripts of these genes were quantified by RT-qPCR in gills, liver and gut of guppies exposed (96 h) to Cu (0, 5, 9 e 20 µg/L) in freshwater and salt water (salinity 24 ppt). New nucleotidic sequences of the genes *CTR1* (1560 bp, complete) and *ATP7B* (617 bp, partial) were identified. These sequences showed high identity values with those described for the killifish *Fundulus heteroclitus* (*CTR1*=81%) and the gilthead sea bream *Sparus aurata* (*ATP7B*=81%). The RT-qPCR data indicated transcription levels for *CTR1* and *ATP7B* in all tissues analyzed. In freshwater guppies, the highest level expression of *CTR1* and *ATP7B* was seen in the liver. In salt water guppies, the highest expression of *CTR1* occurred in the gut, while *ATP7B* was more expressed in the liver and the gut. In freshwater guppies, exposure to Cu increased the Cu content in gills and liver, reduced the *CTR1* and *ATP7B* expression in gills and increased the expression of these genes in liver, without affecting the whole-body Cu content. In saltwater guppies, Cu exposure increased Cu content and reduced *ATP7B* expression in gut, without change in whole-body Cu content. These findings indicate that Cu homeostasis in *P. vivipara* involves down-regulation of the *CTR1* and *ATP7B* expression in gills (freshwater) and gut (salt water) to limit Cu absorption, as well as up-regulation of these genes in the liver (freshwater) to facilitate Cu accumulation and detoxification.

**Keywords:** ATP7B, copper, CTR1, guppy, *Poecilia vivipara*, salinity

### 3. INTRODUÇÃO GERAL

#### 3.1 Cobre

O cobre (Cu) é um metal de transição que desempenha importante papel no metabolismo celular, por atuar como co-fator essencial em muitas rotas enzimáticas, tais como oxidação respiratória, síntese de neurotransmissores, metabolismo do ferro e pigmentação (van den Berghe e Klomp, 2010). Apesar de ser um micronutriente essencial, em excesso o cobre produz efeitos prejudiciais aos animais, incluindo alterações na regulação iônica e endócrina (Craig et al., 2010). Sabe-se também que o cobre é potencialmente tóxico quando acumulado nas células (Petris et al., 2003). Alguns contaminantes metálicos mimetizam moléculas originais em rotas biológicas, causando vários prejuízos às células. Por exemplo, o cobre pode substituir outros metais em domínios de proteínas funcionalmente essenciais (Predki e Sarkar, 1992).

O efeito tóxico do cobre no meio aquático varia entre os organismos, dependendo do tamanho, do estágio de desenvolvimento, entre outros fatores. Sabe-se, também, que a toxicidade do cobre varia com a salinidade. No Brasil, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) dispõe sobre a classificação dos corpos de água e as concentrações limites de cobre dissolvido nesses meios (Resolução nº 357 de 2005), ficando estabelecido 5 µg Cu/L de água salina e 9 µg Cu/L de água doce (CONAMA, 2005). Em ambientes de água salgada, a toxicidade do cobre é reduzida devido à alta concentração de íons do meio, como os de sódio, que competem com o metal pelos sítios de reação no ligante biótico (Lee et al., 2010). Em água doce, a toxicidade do cobre demonstrou ser dependente de uma variedade de parâmetros químicos da água, como por exemplo, dureza e pH (Santore et al., 2001). No entanto, dados de Grosell et al. (2007) relacionados à toxicidade aguda do cobre, mostram que

há maior tolerância ao metal em salinidade intermediária (água salobra) e maior sensibilidade nas salinidades extremas (água doce e salgada).

Em ambientes contaminados, tão importante quanto as informações quantitativas e qualitativas das substâncias prejudiciais, é o conhecimento sobre a biodisponibilidade dos contaminantes para os organismos que habitam o local. A legislação considera, para os critérios de qualidade da água, a fração dissolvida dos metais, mas sabe-se que as partículas em suspensão são mais facilmente disponíveis para a biota (Bidone et al., 2001).

A forma com que o cobre é absorvido se dá de maneira diferente em animais aquáticos e naqueles expostos ao metal em outros meios. Nos mamíferos terrestres, por exemplo, a absorção do metal se dá principalmente pela dieta, através do epitélio intestinal. Nesse caso, o excesso de cobre vai para o fígado e é secretado com a bile no canal alimentar, onde grande parte é reabsorvida pelos enterócitos e o restante é eliminado nas fezes (Linder et al., 1996; Turnlund, 1998; Turnlund et al., 1998; Zimnicka et al., 2011). O fígado é considerado o maior órgão de regulação da homeostase do cobre, seja eliminando o excesso do metal ou, como ocorre com a maioria do cobre absorvido, reciclando-o para seu uso em outras necessidades do metabolismo celular (Zimnicka et al., 2011). Acredita-se que o mecanismo de absorção do cobre no aparelho digestivo se dá inicialmente pelo transporte do metal para a superfície do epitélio intestinal. Em seguida, há uma distribuição intracelular do cobre nos enterócitos e o efluxo do metal dessas células para o sangue (Zimnicka et al., 2007). Já em animais que entram em contato com o cobre através do meio aquático, esse processo pode ocorrer através da alimentação e a partir da água (Kamunde et al., 2002).

No ambiente aquático, o cobre se apresenta como um íon divalente ( $\text{Cu}^{2+}$ ). A propriedade do cobre de possuir mais de um estado de oxidação, pode levá-lo a promover reações que produzem espécies ativas de oxigênio (EAOs), que causam danos



oxidativos nas macromoléculas celulares (Minghetti et al., 2010). Entre esses danos estão a peroxidação de lipídios, danos ao DNA e modificações na homeostasia de diversos minerais essenciais (Jesus e Carvalho, 2008). Portanto, os níveis de cobre devem ser regulados para evitar o acúmulo do metal no meio intracelular e sua possível toxicidade (Petris et al., 2003). Para evitar reações não específicas prejudiciais e habilitar as cuproproteínas, existem proteínas específicas que auxiliam no transporte intracelular do metal. Em peixes, a expressão dessas proteínas é regulada transcricionalmente pela exposição ao cobre (Guo et al., 2004; Minghetti et al., 2010). Entre as proteínas transportadoras estão as de absorção de alta afinidade ao cobre (CTR1), as metalochaperonas - pequenas proteínas citosólicas que distribuem o cobre para diferentes destinos celulares - e as Cu-ATPases (Lutsenko et al., 2007a).

### **3.2 Mecanismos celulares de transporte de cobre**

O cobre no organismo, quando na corrente sanguínea, se liga a aminoácidos ou a proteínas de baixo peso molecular, como a ceruloplasmina e a metalotioneína. Estas proteínas sequestram o cobre intracelular, protegendo a célula contra a toxicidade redox deste metal (Lönnerdal, 2008). Na célula, o transporte específico de cobre é mediado por proteínas, principalmente a CTR1 (Transportador de Cobre de Alta Afinidade) e as Cu-ATPases (Transportador de Cobre dependente de ATP) (Lönnerdal, 2008). Apesar deste conhecimento existente acerca das proteínas envolvidas no transporte do cobre, a absorção desse metal via intestino ainda não é um mecanismo totalmente conhecido (Kaplan e Lutsenko, 2009).

A figura 1 apresenta, de forma esquemática, as principais proteínas envolvidas com o transporte específico de cobre nas células, onde a entrada do metal ocorre, principalmente, através da CTR1 (Transportador de Cobre de Alta Afinidade da espécie Humana). Uma vez no interior célula, o cobre se liga a proteínasceptoras que o

encaminham para as proteínas alvo, como a ATP7A e ATP7B. A movimentação do cobre se dá através de chaperonas, as principais são Atox1, que carrega o Cu até as Cu-ATPases (ATP7A/B) localizadas próximas ao complexo de Golgi, a chaperona CCS leva o metal até as Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) e a Cox17 leva o Cu para a mitocôndria. (Kaplan e Lutsenko, 2009; Mufti et. al., 2007).

A CTR1 também pode estar envolvida na liberação de cobre a partir das vesículas intracelulares geradas pelo complexo de Golgi (Zhou e Gitschier, 1997; van den Berg et al., 2007). Além disso, a ATP7B também realiza a excreção do metal por vesículas (Lutsenko et al., 2007a).

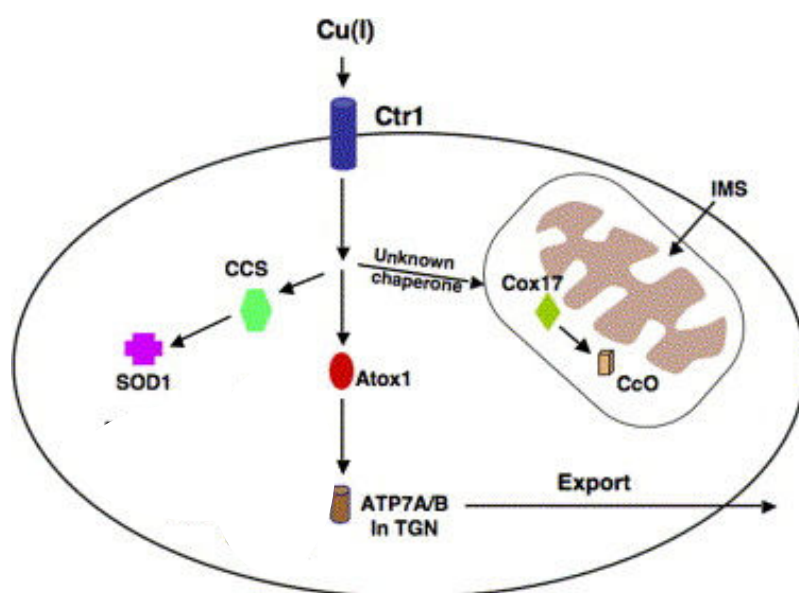


Figura 1: Modelo esquemático do transporte de cobre em uma célula animal. A proteína Ctr1 é responsável pelo influxo do metal e as chaperonas Atox1, CCS e Cox17 são responsáveis por carregar o Cu até as Cu-ATPases (ATP7A/B), a Cu/Zn superóxido dismutase (SOD1) e Citocromo c oxidase (CcO), respectivamente. A maneira pela qual o cobre é transportado a partir do citosol para a mitocôndria em Cox17 ainda não foi completamente elucidado. Adaptado de Mufti et al. (2007).

### 3.2.1 CTR1

A homeostase do cobre é mantida através da absorção do metal, processo este que ocorre principalmente nos enterócitos, e pelo efluxo do cobre para a corrente

sanguínea, e conseqüentemente para o fígado (Kuo et al., 2006). Um importante transportador, responsável pelo influxo de cobre através da dieta, é a proteína transportadora com alta afinidade ao cobre (CTR1). Este transportador é uma proteína integral de membrana composta por três domínios que formam um poro homotrimérico para a entrada do cobre (Mackenzie et al., 2004; Prohaska, 2008). Estudos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* identificaram, pela primeira vez, o gene codificador da CTR1 (Lee et al., 2002; Kuo et al., 2006), a qual está associada à membrana plasmática (Petris et al., 2003).

De acordo com Mackenzie et al. (2004), o gene da CTR1 é altamente conservado desde leveduras até mamíferos e, devido a essa homologia, é possível compreender a base molecular para a regulação de íons cobre em várias espécies. No genoma do peixe zebra há um gene único para a CTR1 e este é essencial para o desenvolvimento do animal, visto que em embriões, a CTR1 é encontrada em níveis elevados em todas as células, mas após a organogênese, a maior captação de cobre, a qual está associada a um maior nível de CTR1, se dá no intestino e órgãos associados (Mackenzie et al., 2004).

Segundo Craig et al. (2009), ocorre um aumento na expressão de CTR1 no intestino e no fígado do peixe zebra após exposição ao cobre dissolvido na água. No entanto, a regulação do transporte de cobre pela CTR1 ainda não é bem conhecida, pois o aumento da concentração de cobre no meio intercelular, não promoveu a passagem de cobre para o interior da célula através da CTR1 (Kuo et al., 2006).

Em camundongos, transcritos da CTR1 foram encontrados em maiores concentrações no fígado, nos rins e nos testículos. No entanto, sabe-se que o estado fisiológico do organismo pode alterar a expressão (Kuo et al., 2006). Por exemplo, foi observado em ratos que todos os tecidos apresentam altos níveis de mRNA de CTR1, seguido por ATP7A e ATP7B, exceto no fígado (Ip et al., 2010).

### 3.2.2 Cu-ATPases

As Cu-ATPases são enzimas que utilizam a energia advinda da hidrólise do ATP (adenosina trifosfato) para realizar o transporte de cobre. Desempenham uma função homeostática, exportando o excesso de cobre da célula, e uma função biossintética, suprindo a necessidade de cobre para as incorporações em diversas enzimas cobre-dependentes (Lutsenko et al., 2007b; Prohaska, 2008). A homeostase do cobre é mantida basicamente através da extrusão do metal via epitélio intestinal, por meio da ATP7A, e da eliminação deste pela bile, nas fezes, através da ATP7B (Lutsenko et al., 2007a; Minghetti et al., 2010). Além disso, o transporte de cobre pode ser regulado pela localização das Cu-ATPases (Lutsenko et al., 2007a). Algumas células e tecidos podem expressar as duas isoformas, e neste caso, não se sabe como ocorre a distribuição de cobre entre a ATP7A e a ATP7B (Lutsenko et al., 2007a).

Em humanos, a importância fisiológica dessas enzimas pode ser verificada pelos efeitos que a inativação das mesmas provoca nas células (Lutsenko et al., 2007a). Por exemplo, a Doença de Menkes resulta de uma mutação no gene que codifica a ATP7A, levando à produção de uma forma não funcional dessa proteína, a qual é encarregada da absorção do cobre no intestino e sua distribuição para o organismo. Por sua vez, a Doença de Wilson, caracterizada pelo acúmulo de cobre no organismo, ocorre devido ao funcionamento incorreto da ATP7B, a qual está presente no Complexo de Golgi para realizar o transporte do cobre do citoplasma para as organelas celulares. O cobre no citoplasma é incorporado à ceruloplasmina para o transporte de várias enzimas e secreção do plasma (Kaplan e Lutsenko, 2009).

Estudada por Samuel Alexander Kinnier Wilson, em 1912, a Doença de Wilson ou Degeneração Hepatolenticular ocorre devido a uma mutação no gene de ATP7B, levando a uma doença metabólica hereditária que provoca o acúmulo de cobre no fígado

e também no cérebro (Mercer e Llanos, 2003; Lutsenko et al., 2007b). O cobre liberado na circulação a partir de hepatócitos danificados acumula-se nos tecidos. Neste caso, a regulação do cobre pelos hepatócitos é, portanto, essencial para a manutenção da homeostase deste metal.

Em 1962, John Menkes descreveu uma doença metabólica que leva a uma deficiência sistêmica profunda de cobre, chamada de "doença do cabelo retorcido", devido à deficiência de uma cuproenzima necessária para a ligação da queratina. Décadas mais tarde, David Danks e colaboradores mostraram que essa doença está relacionada com falhas no transporte de cobre (Bankier, 1995). De acordo com Lutsenko et al.(2007a), a proteína ATP7A atua na extrusão de cobre do epitélio intestinal e mutações no gene que a codifica, fazem com que falhas na ATP7A resultem na saída de todo o cobre dos enterócitos, caracterizando a Doença de Menkes. Esta doença rara é ligada ao cromossomo X, sendo então causada por mutações no gene que codifica a ATP7A, e se caracteriza por uma deficiência geral de cobre e acumulação de cobre nas células intestinais e renais (Madsen e Gitlin, 2008; Minghetti et al., 2010).

A dualidade do cobre – essencialidade e toxicidade – é ilustrada pelas doenças de Menkes e Wilson, conforme descrito acima, o que corrobora com a essencialidade dos transportadores protéicos para manutenção da homeostase do cobre e adequado funcionamento do organismo (Mercer, 1998; Lutsenko et al., 2007b; van den Berghe e Klomp, 2010).

Em animais aquáticos, Craig et al. (2009) demonstrou que a ATP7A é expressa nas brânquias, intestino e fígado do paulistinha (*Dario rerio*), e que o aumento da concentração de cobre na água eleva os níveis de expressão dessa proteína nas células intestinais e hepáticas desta espécie de peixe. O primeiro estudo publicado sobre as estruturas da ATP7A e ATP7B em peixes foi feito por Minguetti et al. (2010) em

*Sparus aurata* e, considerando a estrutura e nível de expressão dessas proteínas, observa-se que há homologia entre os papéis funcionais em teleósteos e tetrápodes.

### 3.3 Modelo experimental: *Poecilia vivipara*

Animais aquáticos são naturalmente expostos a vários metais, cuja forma química e concentração variam com as mudanças da composição e dinâmica da água. Segundo Craig et al. (2010), a química da água exerce importante influência na toxicidade dos metais contaminantes. Os metais traço, como o cobre, apresentam a tendência de se acumular no sedimento, onde podem ser deslocados através da cadeia biológica. Os peixes têm sido amplamente utilizados em estudos de toxicologia aquática e vários trabalhos tem sido realizados para elucidar o efeito dos metais presentes na água sobre a fisiologia desses animais.

Entre os vertebrados, os peixes apresentam diversos mecanismos fisiológicos semelhantes aos dos humanos e outros mamíferos, exemplo disso são os estudos sobre a embriogênese de vertebrados feitos com *Dario rerio* (Oleksiak, 2010). Dentre os modelos experimentais vertebrados usados atualmente, os peixes figuram entre os de menor custo e facilidade de manutenção. Além disso, por ser um grupo diversificado de espécies, é encontrado em uma ampla faixa de condições ambientais.

Nos estudos de toxicologia, devem ser consideradas as vias de contato do animal com o contaminante, que em ambiente aquático são diferentes, o que propicia o estudo de mecanismos específicos. Segundo Kamunde (2002), no caso dos peixes, a captação de contaminantes pode ocorrer através da alimentação, via gastrointestinal, e também a partir da fase dissolvida na água, via branquial.

Diversas pesquisas avaliam os efeitos da exposição ao cobre dissolvido na água em peixes, mas muitos destes focam na toxicidade, com pouca ênfase sobre os possíveis efeitos dessa exposição na homeostase do metal (Kamunde et al., 2002). Apesar dos

vários estudos existentes com o peixe *Poecilia vivipara* (Bloch e Schneider 1801), os aspectos moleculares da fisiologia desta espécie ainda estão poucos elucidados, como a falta de conhecimento sobre o efeito do cobre na expressão de genes importantes para a regulação desse metal, tais como a CTR1 e as Cu-ATPases.

O guarú é eurialino, de pequeno porte (2-5 cm de comprimento), popularmente conhecido como Barrigudinho ou Guarú, pertence à ordem Ciprinodontiformes e à família Poeciliidae. Os indivíduos desta espécie toleram condições ambientais extremas de salinidade e temperatura, possibilitando uma ampla distribuição, estendendo-se ao longo da costa Atlântica da América do Sul. Sua ocorrência é predominante em ambientes lênticos e rasos, próximos às margens (Gomes-Jr, 2006). Peixes da família Poeciliidae podem ser encontrados tanto em ambientes limpos, quanto em corpos d'água contaminados por resíduos domésticos e pluviais (Araújo et al., 2009). São animais vivíparos com fecundação interna (Amaral et al., 2001), apresentam um acentuado dimorfismo sexual, com menor tamanho corporal e coloração mais acentuada nos machos do que nas fêmeas. Os machos possuem ainda um órgão especializado para a reprodução, o gonopódio, formado a partir da nadadeira anal (Gomes-Jr, 2006).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Identificar as sequências nucleotídicas dos genes transportadores de cobre *CTR1* e *ATP7* no peixe *Poecilia vivipara* e avaliar os níveis transcricionais destes genes em resposta à exposição ao cobre e salinidade.

#### 4.2 Objetivos Específicos

- Identificar as sequências dos genes *CTR1* e *ATP7* em *P. vivipara*.
- Verificar o padrão transcricional dos genes *CTR1* e *ATP7* nos órgãos brânquias, fígado e intestino de *P. vivipara* aclimatados à água doce e salgada.
- Analisar a acumulação tecidual de Cu e a influência deste metal na expressão dos genes *CTR1* e *ATP7* em *P. vivipara* aclimatado à água doce e salgada.

#### 5. ARTIGO:

Título: Salinity effects on copper accumulation in the guppy *Poecilia vivipara* are associated with *CTR1* and *ATP7B* transcriptional regulation.

Revista: Aquatic Toxicology

Autores: Evelise Sampaio da Silva, Sandra Isabel Moreno Abril, Juliano Zanette e Adalto Bianchini



**Salinity effects on copper accumulation in the guppy *Poecilia vivipara* are associated with *CTR1* and *ATP7B* transcriptional regulation.**

Evelise Sampaio da Silva, Sandra Isabel Moreno Abril, Juliano Zanette and Adalto Bianchini\*

Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada,  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brazil 96203-900.

\*Corresponding author: Adalto Bianchini

Instituto de Ciências Biológicas (ICB)

Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Campus Carreiros, Av. Itália km 8

Rio Grande, RS, 96203-900, Brazil

Phone: +55-53-32935255

FAX: +55-53-32336633

E-mail: [adaltobianchini@furg.br](mailto:adaltobianchini@furg.br)

## ABSTRACT

It is well accepted that environmental changes in salinity is a major factor influencing the metal accumulation and toxic effects in aquatic organisms. We addressed the effects of salinity (0 and 24 ppt) in the accumulation of Cu after 96 hrs waterborne exposure to 0, 5, 9 and 20  $\mu\text{g}$  Cu/L and the possible regulation of key genes involved in the Cu homeostasis in the eurihaline guppy *Poecilia vivipara*, recently suggested as a model fish for environmental studies in South America. The dose-response Cu accumulation in gill and liver observed only in the fresh water and the dose-response Cu accumulation in the gut only in saltwater, suggested that Cu accumulation in *P. vivipara* is salinity- and organ-dependent. In order to identify key genes involved in the Cu metabolism we sequenced, for the first time, transcripts that code for the high-affinity copper transporter (CTR1) and copper-transporting ATPase (ATP7B) in *P. vivipara* using Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing. The full-length *CTR1* open reading frame (1560 bp) and a partial *ATP7B* (690 bp) was uncovered and codes for amino acid sequence that shared high identities with the CTR1 of the killifish *Fundulus heteroclitus* (81%) and the ATP7B (87%) of *Sparus aurata* fish. Basal transcriptional levels, addressed by RT-qPCR in control fish, indicate that *CTR1* and *ATP7B* was highly expressed in the liver of freshwater guppies and *CTR1* in the gut of saltwater guppies, which could explain in part the high Cu accumulation observed in liver in freshwater and in gut in saltwater, considering that CTR1 is involved in the Cu uptake. After Cu exposure, guppies showed a reduced *CTR1* expression in the gills (20  $\mu\text{g}$  Cu/L in freshwater and 5  $\mu\text{g}$  Cu/L in saltwater), comparing with the controls. In turn, *ATP7B* was mainly reduced in gut by exposure to 9 and 20  $\mu\text{g}$  Cu/L in fresh water and by 20  $\mu\text{g}$  Cu/L in salt water. Both, *CTR1* and *ATP7B* were unaltered in the liver by Cu exposure. Those results suggest that *CTR1* is down-regulated in gills and *ATP7B* in gut to limit Cu absorption, and *CTR1* and *ATP7B*

are unaltered in liver, to facilitate Cu storage and detoxification. Taken altogether, these findings clearly indicate that salinity influences the Cu accumulation in *P. vivipara* organs and also suggests that homeostasis involves differential expression of the transcriptional regulation of the newly identified Cu transporters *CTR1* and *ATP7B*.

**Keywords:** ATP7B, copper, CTR1, guppy, *Poecilia vivipara*, salinity

## INTRODUCTION

The guppy *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiforme, Poeciliidae) inhabiting the coastal water bodies from Argentina to Venezuela (Froese and Pauly, 2001), have been suggested as a model specie in South American environmental toxicology (Mattos et al., 2010; Ferreira et al., 2012; Zimmer et al., 2012; Dorrington et al., 2012). The use of fish in toxicological studies includes the analysis of the fate of contaminants in aquatic environments (Burnet et al., 2007; Matson et al., 2008) and the genetic aspects involved in adaptation to survive in extreme polluted conditions (Williams and Oleksiak, 2008; Wirgin et al., 2011). Data from these studies help to elucidate the biochemical and molecular mechanisms involved in toxicity (Hahn et al., 2004).

Copper (Cu) plays an important role in cellular metabolism as an essential cofactor, participating in respiratory chain, neurotransmitter synthesis, iron metabolism and pigmentation (Mercer and Llanos, 2003; van den Berghe and Klomp, 2010). Despite its biological essentiality, elevated concentrations of Cu can cause adverse physiological effects, including changes in ion and endocrine regulation (Craig et al., 2010). Therefore, there are specific proteins involved in the intracellular transport of Cu to avoid non-specific and harmful reactions, as well as enable cuproproteins. In fish, the expression of those proteins is regulated at the transcriptional level by Cu exposure (Guo et al., 2004; Minghetti et al., 2010). The high affinity proteins of Cu uptake (CTR1), metallochaperones and Cu-ATPases are some examples of proteins involved in intracellular transport of Cu (Lutsenko et al., 2007).

The first study on the structures of Cu-ATPases (ATP7A and ATP7B) in teleosts was reported by Minghetti et al. (2010) in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Considering the structure and level of expression of these proteins, it could be expected some homology between their functional roles in teleosts and tetrapods. Cu-ATPases

are enzymes playing biosynthetic and homeostatic functions. They supply Cu to the cells and export the metal excess from intestinal and hepatic cells (Lutsenko et al., 2007; Prohaska, 2008; Minghetti et al., 2010).

The CTR1 is a major carrier responsible for the influx of Cu through the diet (Mackenzie et al. 2004; Prohaska, 2008). This transporter is an integral membrane protein composed of three domains that form a homotrimer pore for Cu entrance (Mackenzie et al. 2004; Prohaska, 2008). According to Mackenzie et al. (2004), there is a single gene for *CTR1* in the genome of the zebrafish *Danio rerio*, being essential for the embryonic development of this fish species. Moreover, this gene is highly conserved from yeast to mammals. Based on this homology, it is possible to understand the molecular basis for the regulation of Cu ions in several species.

In the present study, fish were 96 hrs-exposed to Cu (5, 10 and 20 µg/L) in fresh and salt water (24 ppt) aiming to: 1) evaluate the effects of different salinities in the Cu accumulation in different *P. vivipara* organs (gill, liver, gut and whole body); 2) uncover the *CTR1* and *ATP7* nucleotide sequences in *P. vivipara*, and 3) investigate the regulation of those key genes in the transcriptional level and the possible association with the changes in salinity and Cu accumulation in different organs of *P. vivipara*.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Fish collection and maintenance**

Adult male *P. vivipara* (wet body weight:  $1.1 \pm 0.3$  g; total body length:  $42 \pm 4$  mm) were caught using a pound fish net in March 2011 at the 'Arroio do Gelo', a small creek into the Cassino Beach (Rio Grande, RS, southern Brazil). Fish were acclimated to fresh and salt water (24 ppt) for at least 4 weeks. They were fed twice a day with commercial fish diet (Alcon Basic MEP 200 Complex). Room temperature (20°C) and

photoperiod (12L:12D) were fixed. Procedures used in the experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of the Federal University of Rio Grande.

### **Copper exposure**

Fish were kept under control conditions (no Cu addition to the water) or exposed (96 h) to different waterborne Cu concentrations (5, 9, and 20  $\mu\text{g/L}$ ), which were obtained adding Cu from a stock solution of  $\text{CuCl}_2$  (Vetec Química Fina, São Paulo, Brazil). The concentrations of 5 and 9  $\mu\text{g/L}$  actually correspond to the Brazilian water quality criteria for sea water and freshwater, respectively. In turn, 20  $\mu\text{g/L}$  was selected as a non-conforming copper concentration according to the Brazilian regulation (CONAMA, 2005). All experimental media were prepared 24 h before fish introduction into the experimental chamber to allow the complete equilibration of Cu with the experimental media. Fish were exposed in 30-L glass aquaria containing continuously aerated freshwater or salt water (24 ppt). They were not fed during the experiment. Fish stocking density was 1 g fish.L<sup>-1</sup>. The experimental media was completely renewed every day with a fresh medium prepared as described above.

Before and 24 h after fish introduction into the experimental chamber, water samples (10 mL) were collected and filtered (0.45- $\mu$  mesh filter) for measurement of the dissolved Cu concentration by flame atomic absorption spectrophotometry (AAS, Avanta 932 Plus, GBC, Hampshire, IL, USA), following procedures previously described (Pinho et al., 2007; Martins and Bianchini, 2008; Lopes et al., 2011).

### **Copper accumulation**

A second exposure was performed using the same experimental design and procedures described above to evaluate whole-body and tissue Cu accumulation in *P. vivipara*. After 96 h of exposure, fish from the control and Cu treatments (n = 4-6 per

treatment) were randomly collected, weighed (wet weight), and completely digested in 1 N HNO<sub>3</sub> for 48 h at 60°C. Fish from the control and Cu treatments (n = 4-6 were also randomly collected and had their tissues (gill, liver and gut) dissected, weighed (wet weight), and completely digested in 1 N HNO<sub>3</sub> for 48 h at 60°C. Digested samples were analyzed for Cu content by flame atomic absorption spectrophotometry (AAS, Avanta 932 Plus, GBC, Hampshire, IL, USA) against certified standards (Tritisol-Merck), following procedures previously described (Pinho et al., 2007; Martins and Bianchini, 2008; Lopes et al., 2011; Carvalho et al., 2013). Data were expressed as µg/g wet tissue.

### **Identification of *CTRI* and *ATP7B* transcripts**

Liver from *P. vivipara* kept under control conditions (no Cu addition into the water) and randomly selected was dissected and used for total RNA extraction. Total RNA was isolated using Qiazol reagent (Qiagen). The RNA quantity and quality was determined in a standard agarose gel electrophoresis, running 5 µ L of sample plus 2 µL of loading buffer. The cDNA was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), a mix of anchored oligo (dT) primer (MWG Biotech, Inc.) with random hexamer primer (provided in the reverse transcriptase kit) and RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen).

Previously characterized sequences for the gilthead sea bream *S. aurata ATP7A*, *ATP7B* and *CTRI* (GenBank accession numbers GQ200817, GQ200818 and AJ630205) (Minghetti et al., 2008; 2010) were employed for searching *Poecilia sp.* homologous sequences in the NCBI nucleotide collection (nr/nt) of (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the tBLASTx tool. Since no similar sequences were found, we searched in the expressed sequence tag (EST) databases, using the same strategy. Two *Poecilia reticulata* sequences (GenBank accession numbers ES377442 and ES383386) were found and used to obtain an 877 bp nucleotide contig sequence using CAP3 software

(Huang and Madan, 1999). This *P. reticulata* contig showed 81% nucleotide identity with *S. aurata ATP7B* and 65% with the *ATP7A* sequence and was used to design forward and reverse PCR primers to amplify an *ATP7B* initial fragment in *P. vivipara*.

Two EST sequences of the cyprinodontiform fish *Xiphophorus maculatus* (GenBank accession numbers FK034537 and FK034350) and two EST sequences of the cyprinodontiform fish *Fundulus heteroclitus* (GenBank accession numbers DR047272 and DR047154) were found and used to create two nucleotide contig sequences, that shared high nucleotide identities (91 and 92%) with the *S. auratus CTR1* sequence (GenBank accession number AJ630205). The *CTR1* from *X. maculatus* or *F. heteroclitus* were aligned to create two consensus sequences with 577 bp and used to design forward and reverse PCR primers in order to amplify the *P. vivipara CTR1* initial fragment. Primers used for polymerase chain reactions (PCR) are shown in Table 1. PCR were carried out for *CTR1* and *ATP7B* of *P. vivipara* using 94°C for 2 min followed by 30 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 1 min, followed by 72°C for 7 min, with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). PCR products were resolved on a 1% agarose gel and then isolated and purified using Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and ligated in pGEM-T Easy Vector (Promega), and transformed into *E. coli* (TOP 10 Kit, Invitrogen). Plasmids were purified from cultures of positive clones (QiaPrep™, Qiagen) and sequenced (MWG Biotech). The 5' and 3' ends of *CTR1* transcript were obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE) with the BD Smart™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). Nucleotide sequences were obtained using an ABI Prism 3130xl platform (Applied Biosystems), translated to the predicted amino acid sequences and aligned with other sequences using ClustalW (Thompson et al., 1994). Calculation of identities among nucleotide and amino acid predicted sequences were performed using the Bioedit Sequence Alignment Editor Software (Hall, 1999).



## **Quantification of *CTRI* and *ATP7B* transcriptional levels**

After the 96-h period of the first exposure experiment, fish kept under control conditions (no Cu addition into the water) or exposed to Cu were killed by cervical section and liver, gut and gills of individual fish were dissected. Sample tissues (n = 5 per treatment) were immediately placed in RNAlater (Ambion), kept at 4°C for 24 h, and stored at -80°C until analysis.

Total RNA from samples was extracted and cDNA was synthesized as described above. Gene-specific primers for *P. vivipara CTRI*, *ATP7B* and *EF1- $\alpha$*  were designed with Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000). Primers for *P. vivipara  $\beta$ -actin* gene were previously tested and used (Ferreira et al., 2012). Primers were obtained from IDT Integrated DNA Technologies (Table 1). Real-time PCR (qPCR) was performed using GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI), following the manufacturer's instructions, and a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). For both genes, expression was analyzed in duplicate using the following protocol: 50°C for 2 min, 95°C for 2 min, and 45 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 30 s. Melting curve analysis was performed on the PCR products at the end of each PCR run to ensure that a single product was amplified. The  $E^{-\Delta Ct}$  ( $E^{-(\text{target gene} - \text{housekeeping gene})}$ ) method (Schmittgen and Livak, 2008) was used to compare *CTRI* and *ATP7B* levels among different organs and salinities. The up- or down-regulation in the *CTRI* and *ATP7B* genes caused by Cu exposure was calculated using the REST 2009 software (Qiagen). The average of the housekeeping genes *EF-1 $\alpha$*  and  *$\beta$ -actin* Ct values was used in the relative transcriptional level calculation for the target gene.

## **Data presentation and statistical analysis**

Equality of variance was tested, accepting  $p > 0.05$  (Bartlett's test) (Prism 4, GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Transcriptional levels of *ATP7B* and *CTR1* in gills, liver and intestine of the guppy *Poecilia vivipara* from the control group acclimated to different salinities were logarithmically transformed to improve equality of variances. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error or fold induction/repression relative to control group. Difference among mean values was accessed by One-Way Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Duncan's (n=4-6) or Newman-Keuls post hoc test (n=3-5). Significant fold induction or repression for *ATP7B* and *CTR1* transcript levels, in response to Cu exposure in respect to control, was evaluated using REST 2009 software Qiagen. In all cases, the significance level adopted was 5% ( $p < 0.05$ ).

## **RESULTS**

### **Copper concentration in the exposure media**

Measured dissolved Cu concentrations in the exposure media were  $6.6 \pm 1.2$ ,  $11.3 \pm 1.9$ , and  $19.2 \pm 2.1$   $\mu\text{g/L}$  in freshwater and  $6.1 \pm 0.9$ ,  $9.4 \pm 1.3$ , and  $17.5 \pm 2.8$   $\mu\text{g/L}$  in salt water, corresponding to the nominal concentrations of 5, 9 and 20  $\mu\text{g/L}$ , respectively.

Concentration of Cu in the control media was always below the detection limit ( $<5$   $\mu\text{g/L}$ ). Once no marked differences were observed between nominal and measured dissolved Cu concentrations, nominal values will be employed hereafter.

### **Copper accumulation**

No significant Cu accumulation was observed in whole-body fish exposed to Cu in freshwater (Fig. 1A) and salt water (Fig. 1B). However, Cu was significantly accumulated in gills and liver of freshwater guppies. This accumulation was dependent

on the Cu concentration in the water. In the other hand, no significant Cu accumulation was observed in the gut of these guppies (Fig. 1A). Also, no significant Cu accumulation was observed in gills and liver of saltwater guppies after exposure to the metal. However, Cu was significantly accumulated in the gut of these fish. This accumulation was not dependent on the Cu concentration in the water (Fig. 1B).

### **Identification of *CTR1* and *ATP7B* transcripts**

Using PCR and RACE we were able to identify a *CTR1* mRNA sequence in *P. vivipara* with 1560 bp, covering around 29 % of the complete mRNA sequence, comparing with the 4567 bp full length *CTR1* mRNA of *D. rerio* (Genbank NM\_205717.2). The obtained *CTR1* sequences from *P. vivipara* include the complete open reading frame with 582 bp that code for a protein with 193 aminoacids (Fig. 2). The alignment of the *P. vivipara* *CTR1* aminoacid predicted sequence showed 93.8 % and 81.2 % identity comparing with the *CTR1* from the cyprinodontiformes *Xiphophorus maculatus* and *F. heteroclitus* and 69.5 % identity comparing with the cypriniform *Danio rerio* (Table 2). Those percent identities from the alignment (Fig. 2) and the phylogenetic tree comparing the *P. vivipara* *CTR1* to sequences of other organisms (Fig. 3) allowed us to proceed with the annotation of the new *P. vivipara* transcript sequence as *CTR1* (accession number KC862327). Using a similar approach we were able to obtain a transcript for *ATP7* in *P. vivipara* with 690 bp (accession number KC862326), corresponding to ~ 18 % coverage in respect to the complete *S. aurata ATP7B* sequence, based on the nucleotide sequence alignment. The *P. vivipara* *ATP7B* predicted amino acid sequence shares 85% and 71 % identity with the corresponding region of the perciform gilthead sea bream *S. aurata ATP7B* and *ATP7A*, respectively.

### ***CTRI* and *ATP7B* organ-distribution and salinity effects**

The basal transcriptional levels of *ATP7B* and *CTRI* in different organs of control guppies acclimated to freshwater and salt water are shown in figure 4. The *ATP7B* expression was much lower in gills than in liver and gut of both freshwater and seawater guppies. Transcriptional levels for *CTRI* are considerable in all three organs analyzed (Fig. 4).

The acclimation to fresh water resulted in increased *ATP7B* and *CTRI* transcriptional levels in liver, comparing to liver from fish acclimated to salt water (24 ppt) and comparing to transcriptional levels in intestine and gill.

The acclimation to salt water caused increased *CTRI* levels in intestine, comparing to intestine from fish acclimated to fresh water (Fig. 4).

### **Effect of copper exposure on *ATP7B* and *CTRI* gene expression**

In fish acclimated to fresh water, the expression of the *ATP7B* in the intestine was repressed after 96 hrs exposure to 9 and 20  $\mu\text{g/L}$  of Cu, comparing to the control group. Similarly, in fish acclimated to salt water, *ATP7B* was also repressed in intestine of fish exposed to 20  $\mu\text{g/L}$  of Cu, comparing to the control. In addition to the alterations caused in the intestine by Cu exposure, in the fish acclimated to salt water, but not fresh water, the *ATP7B* was also reduced in the gill, when fish was exposed to 5  $\mu\text{g/L}$  of Cu (Fig. 5).

The transcript levels of *CTRI* were altered by Cu exposure only in gill, but not in the other organs. In the fresh water and salt water *CTRI* was repressed in gill of fish exposure to 20  $\mu\text{g/L}$  and 5  $\mu\text{g/L}$  of Cu, respectively.

No significant alteration in *ATP7B* and *CTRI* expression in response to Cu was observed in the liver of freshwater or salt water acclimated guppies (Fig. 5).

## DISCUSSION

Some chemical elements, such as Cu, can be essential to the organism at low concentrations, but also can show toxicity when at excessive levels in the water. Therefore, it is crucial to understand the mechanisms involved in their homeostasis and their fate in the animal's body. In this context, cyprinodontiform fish, like the killifish *Fundulus heteroclitus* (Hahn et al., 2004; Matson et al., 2008) and the South American guppy *Poecilia vivipara* (Mattos et al., 2010; Ferreira, 2012; Zimmer et al., 2012), have been used as biological models in toxicological studies because of their high tolerance to contaminated environments.

In mammals, homeostasis of Cu is maintained based on the rates of its absorption, especially by the enterocytes, and its excretion through the liver (Kuo et al., 2006). It is believed that the mechanism of Cu absorption occurs at the digestive tract by transporting the metal through the gut epithelium surface. This process is followed by an intracellular distribution of Cu inside the enterocytes, which ends with the efflux of Cu from these cells into the blood stream (Zimnicka et al., 2007). In zebrafish *D. rerio*, the enhanced uptake of Cu was shown to take place at the intestine and associated organs, being paralleled by an increased level of *CTR1* expression (Mackenzie et al., 2004). In mammals, CTR1 protein is also found in renal cells and hepatocytes (Kaplan and Lutsenko, 2009). In humans, the excess of Cu absorbed is accumulated in the liver and secreted with the bile in the alimentary canal, where part of the Cu secreted is reabsorbed by enterocytes and the remainder is eliminated in feces (Linder et al., 1996; Turnlund, 1998; Turnlund et al., 1998; Zimnicka et al., 2011).

Regarding the mechanisms involved in Cu transport across the cell membranes, it was shown that Cu is absorbed by the CTR1 protein in humans (Lutsenko et al., 2007; Lönnerdal, 2008; La Fontaine et al., 2010). According to Mackenzie et al. (2004), the

CTR1 protein is also responsible for Cu transport in zebrafish *D. rerio*, being found mainly in liver, gut and related organs. In humans, the absorbed Cu is distributed inside the enterocyte, thus reaching the ATP7, which is a protein involved in Cu exportation from the cell. It is interesting to note that the *ATP7A* is expressed in the majority of tissues, while the *ATP7B* expression is more restricted, shown to be present in the small intestine (Lutsenko et al., 2007; Lönnerdal, 2008; La Fontaine et al., 2010).

Although it is reported that the largest uptake of Cu is associated with a higher level of *CTR1* and takes place at the gut and associated organs in zebrafish *D. rerio* (Mackenzie et al., 2004), further studies are necessary using a range of Cu concentrations, different times of exposure and with different organs other than the gut to better understand the transcriptional regulation of *CTR1* and Cu-ATP metabolism. In the present study, we have evaluated the expression of both *CTR1* and *ATP7B* in gills, liver, and gut of the guppy *P. vivipara* acclimated to freshwater or salt water (salinity 24 ppt) either in the absence or in the presence of dissolved waterborne Cu at different concentrations (5, 9, and 20 µg/L).

In control guppies (non-exposed to Cu), a new and complete mRNA sequence (1560 bp) was identified for *CTR1* in the guppy *P. vivipara*. This new sequence showed 81% identity when compared with the same region of the *CTR1* of the killifish *F. heteroclitus*. Regarding the *ATP7*, it was reported that *ATP7A* and *ATP7B* are related in structure and function, with about 60% amino acid identity (La Fontaine et al., 2010). In light of this and considering the facts that the Cu-ATP transporters are more complex structures and that human *ATP7A* has 150 kbp and *ATP7B* has 80 kbp, we believe that in the present study we have identified only a partial sequence of *ATP7B* in the guppy *P. vivipara*. In fact, the *ATP7B* sequence obtained shares 74 and 81% identity with the corresponding region of the *ATP7A* and *ATP7B* of the gilthead sea bream *S. aurata*, respectively. Taken altogether, findings described for the *CTR1* and *ATP7B* sequences

in the present study indicate that genes related to Cu transport can be highly conserved among vertebrates, as previously suggested by Mackenzie et al. (2004).

Data on tissue-specific gene expression showed a higher relative expression of *CTR1* in the liver of *P. vivipara* acclimated to freshwater. According to Mackenzie et al. (2004), the CTR1 protein is also responsible for Cu transport in the zebrafish *D. rerio*, being found mainly in liver, gut and related organs of this freshwater fish. In turn, Craig et al. (2009) showed an increased expression of *CTR1* in liver of zebrafish after 21 days exposure to dissolved Cu (12 µg/L) in freshwater. In the present study, a similar response was observed in the guppy *P. vivipara* acclimated to freshwater and exposed to Cu at 20 µg/L. It is interesting to note that this increased *CTR1* expression was paralleled by an also increased content of Cu in the liver of freshwater guppies exposed to the metal, indicating that liver is playing an important role in Cu homeostasis in the guppy *P. vivipara* acclimated to freshwater by removing the excess of metal from the blood stream and storing it.

In the present study, we also found expression of *ATP7B* in all tissues analyzed in the guppy *P. vivipara* acclimated to fresh or salt water. It was previously shown that the *ATP7A* is also expressed in gills, gut and liver of the zebrafish *D. rerio* (Craig et al., 2009). In mammals, some studies reported that *ATP7B* expression is more restricted, being mainly expressed in liver, thus suggesting more specialized functions for this transporter, such as excretion of Cu. In turn, the role of *ATP7B* in the intestine is still unclear (Lutsenko et al., 2007; Kaplan and Lutsenko, 2009; La Fontaine et al., 2010).

In *P. vivipara*, the mRNA level of *ATP7B* was generally higher in liver of both freshwater and saltwater acclimated guppies. Furthermore, we observed an increased *ATP7B* expression in the liver of *P. vivipara* exposed to Cu in freshwater. This finding is in complete agreement with that reported by Craig et al. (2009), who showed that the increased Cu uptake from the water raises the level of *ATP7A* expression in the

intestinal and hepatic cells of the zebrafish *D. rerio*. All these findings together with those discussed above for *CTR1* support the idea that liver is the main organ involved in Cu homeostasis in fish, as reported for mammals (Mercer and Llanos, 2003; Zimnicka et al. 2011).

In light of the above, it is clear that liver plays an important role in Cu homeostasis in both freshwater and seawater fish by removing the excess of metal or recycling it to supply the cellular metabolic needs. In turn, absorption of dissolved Cu in freshwater fish would occur mainly through the gills, while the gut would play also an important role in Cu absorption from the ingested water in saltwater fish, especially in the absence of food, as tested in the present study. It is worth to note that water ingestion is only significant in seawater fish, because of their need to gain water from the ingested salt water after desalinization in the gut to compensate the osmotic loss of water through the gills and the water loss to produce urine (Schmidt-Nielsen, 1997).

In light of the background described above, it would be expected that expression of Cu transporters (*CTR1* and *ATP7B*) could be seen also in the gills and gut of freshwater and saltwater fish. One also would expect that the expression of these proteins would be down-regulated in gills and gut after exposure to high concentrations of dissolved waterborne Cu in order to limit the absorption of this metal by freshwater and saltwater fish, respectively. In fact, *CTR1* and *ATP7B* expression was observed in gills and gut of both freshwater and saltwater *P. vivipara*. Furthermore, a Cu concentration-dependent down-regulation of both Cu transporters (*CTR1* and *ATP7B*) was observed in gills of freshwater guppies exposed to waterborne Cu. In this case, the reduced gene expression observed seems to be regulated by an increased Cu content in the gill. This statement is based on the fact that an increased Cu content was observed in gills of both freshwater and saltwater *P. vivipara* after exposure to waterborne Cu.



Regarding salt water guppies, we observed a marked high level of *CTR1* expression in the gut of these fish. This finding is in complete agreement with the fact that the Cu-transporter *CTR1* was also mainly expressed in the intestine of the gilthead sea bream *Sparus aurata* (Minghetti et al., 2008). These authors also reported that the mRNA level of *CTR1* was differentially regulated by dietary or waterborne Cu. In *P. vivipara* acclimated to salt water, we have also observed that exposure to waterborne dissolved Cu markedly reduced both *CTR1* and *ATP7B* expression in the fish gut. It is worth to note that this reduced gene expression was paralleled by an increased Cu content in the gut of guppies acclimated to salt water. Therefore, it is completely possible to consider that the down-regulation of Cu transporters observed in the gut of saltwater *P. vivipara* was a response to limit Cu absorption from ingested water.

Finally, all responses observed at the gene expression level described and discussed above are certainly part of the mechanisms involved in Cu homeostasis in *P. vivipara* acclimated to fresh or salt water. This statement is based on the fact that no significant change in whole-body Cu was observed in freshwater and saltwater guppies after 96 h of exposure to waterborne Cu.

## CONCLUSIONS

The present study shows that *CTR1* and *ATP7* sequences are highly conserved in the guppy *P. vivipara*, when compared to other fish species, supporting the idea that the involvement of these genes in Cu metabolism is widespread among vertebrates. The identification of the new sequences for *CTR1* and *ATP7B* in *P. vivipara* gives us support for further future studies using this South American Cyprinodontiform fish as a model species in environmental toxicology. Data on tissue-specific gene expression in control fish (non-exposed to Cu) showed that both *CTR1* and *ATP7B* are differentially

expressed in gills, liver and gut of guppies. Also, it is clear from the data reported in the present study that *CTR1* and *ATP7B* expression depends on the salinity. Finally, data on gene expression together with those of whole-body and tissue Cu content indicate that Cu homeostasis in the guppy *P. vivipara* involves the down-regulation of the expression of Cu transporters (*CTR1* and *ATP7B*) in organs associated with Cu absorption (gills in freshwater guppies and gut in both salinities guppies) and absence of changes of these proteins in organs related to Cu storage and detoxification (liver in freshwater guppies), when fish are exposed to a higher concentration of free Cu ion, such as in freshwater.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Financial support is acknowledged to the International Development Research Centre (IDRC, Ottawa, Canada), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES – Programa Ciências do Mar, Brasília, DF, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática, Brasília, DF, Brazil). A. Bianchini is a research fellow from the Brazilian CNPq (Proc. # 304430/2009-9) and supported by the International Canada Research Chair Program from IDRC.

## **REFERENCES**

Burnett, K.G., Bain, L.J., Baldwin, W.S., Callard, G.V., Cohen, S., Di Giulio, R.T., Evans, D.H., Gomez-Chiarri, M., Hahn, M.E., Hoover, C.A., Karchner, S.I., Katoh, F., MacLatchy, D.L., Marshall, W.S., Meyer, J.N., Nacci, D.E., Oleksiak, M.F., Rees, B.B.,

Singer, T.D., Stegeman, J.J., Towle, D.W., Van Veld, P.A., Vogelbein, W.K., Whitehead, A., Winn, R.N., Crawford, D.L. 2007. *Fundulus* as the premier teleost model in environmental biology: Opportunities for new insights using genomics. *Comp. Biochem. Physiol.* 2D, 257-286.

Carvalho, P.C., Bugoni, L., McGill R.A.R., Bianchini, A. 2013. Metal and selenium concentrations in blood and feathers of petrels of the genus *Procellaria*. *Environ. Toxicol. Chem.* In Press.

CONAMA. 2005. Resolução nº 357 de 11 de março de 2005, que dispõe sobre diretrizes de enquadramento dos corpos d'água e dá outras providências. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> (accessed in December 2012).

Craig, P.M., Wood, C.M., McLelland, G.B. 2010. Water chemistry alters gene expression and physiological end points of chronic waterborne copper exposure in zebrafish, *Danio rerio*. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2156-2162.

Craig, P.M., Galus, M., Wood, C.M., McLelland, G.B. 2009. Dietary iron alters waterborne copper-induced gene expression in soft water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, 362-373.

Dorrington, T., Zanette, J., Zacchi, F.L., Stegeman, J.J., Bairy, A.C., 2012. Basal and 3-methylcholanthrene-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in the Brazilian guppy, *Poecilia vivipara*. *Aquat. Toxicol.* 124-125C, 106-113.

Ferreira, R.S., Monserrat, J.M., Ferreira, J.L.R., Kalb, A.C., Stegeman, J., Bainy, A.C.D, Zanette, J. 2012. Biomarkers of organic contamination in the South American fish *Poecilia vivipara* and *Jeninsia multidentata*. J. Toxicol. Environ. Health 75A, 1-11.

Froese, R., Pauly, D. 2011. FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) (accessed in June 2011).

Guo, Y., Smith, K., Lee, J., Thiele, D.J., Petris, M.J. 2004. Identification of methionine-rich clusters that regulate copper stimulated endocytosis of the human *CTR1* copper transporter. J. Biol. Chem. 279, 17428-17433.

Hahn, M.E., Karchner, S.I., Franks, D G., Merson, R.R. 2004. Aryl hydrocarbon receptor polymorphisms and dioxin resistance in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). Pharmacogenetics 14, 131-143.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95-98.

Huang, X., Madan, A. 1999. A DNA sequence assembly program. Genome Res. 9, 868-877.

Kaplan, J.H., Lutsenko, S. 2009. Copper transport in mammalian cells: Special care for a metal with special needs. J. Biol. Chem. 284, 25461-25465.

Kuo, Y.M., Gybina, A.A., Pyatskowitz, J.W., Gitschier, J., Prohaska, J.R. 2006. Copper transport protein (Ctr1) levels in mice are tissue specific and dependent on copper status. *J. Nutr.* 136, 21-26.

La Fontaine, S., Ackland, M.L., Mercer, J.B. 2010. Mammalian copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B: Emerging roles. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 42, 206-209.

Linder, M.C., Hazegh-Azam, M. 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 797S-811S.

Lönnerdal, B. 2008. Intestinal regulation of copper homeostasis: a developmental perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 846S-850S.

Lopes, T.M., Barcarolli, I.F., Oliveira, C.B., Souza, M.M., Bianchini, A. 2011. Mechanisms of copper accumulation in isolated mantle cells of the marine clam *Mesodesma mactroides*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1586-1592.

Lutsenko, S., Barnes, N.L., Bartee, M.Y., Dmitriev, A.O.Y. 2007. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol. Rev.* 87, 1011-1046.

Mackenzie, N.C., Brito, M., Reyes, A.E., Allende, M.L. 2004. Cloning, expression pattern and essentiality of the high-affinity copper transporter 1 (CTR1) gene in zebrafish. *Gene* 328, 113-120.

- Martins, S.E., Bianchini, A. 2008. Copper accumulation and toxicity in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832 (Teleostei, Carangidae). Pan-American J. Aquat.Sci. 3, 384-390.
- Matson, C.W., Clark, B.W., Jenny, M.J., Fleming, C.R., Hahn, M.E., Di Giulio, R.T. 2008. Development of the morpholino gene knockdown technique in *Fundulus heteroclitus*: A tool for studying molecular mechanisms in an established environmental model. Aquat. Toxicol. 87, 289-295.
- Mattos, J.J., Siebert, M.N., Luchmann, K.H., Granucci, N., Dorrington, T., Stoco, P.H., Grisard, E.C., Bainy, A.C.D. 2010. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. Mar. Environ. Res. 69, S31-S33.
- Mercer, J.F.B., Llanos, R.M. 2003. Molecular and cellular aspects of copper transport in developing mammals. J. Nutr. 133, 1481S -1484S.
- Minghetti, M., Leaver, M.J., George, S.G. 2010. Multiple Cu-ATPase genes are differentially expressed and transcriptionally regulated by Cu exposure in sea bream, *Sparus aurata*. Aquat. Toxicol. 97, 23-33.
- Minghetti, M., Leaver, M.J., Carpena, E., George, S.G. 2008. Copper transporter 1, metallothionein and glutathione reductase genes are differentially expressed in tissues of sea bream (*Sparus aurata*) after exposure to dietary or waterborne copper. Comp. Biochem. Physiol. 147C, 450-459.

- Pinho, G.L.L., Pedroso, M.S., Rodrigues, S.C., Souza, S.S., Bianchini, A. 2007. Physiological effects of copper in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: waterborne versus waterborne plus dietborne exposure. *Aquat. Toxicol.* 84, 62-70.
- Prohaska, J.R. 2008. Role of copper transporters in copper homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 826S-829S.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365-386.
- Schmidt-Nielsen, K. 1997. *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. Cambridge University Press, London, 607 p.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3, 1101-1108.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-680.
- Turnlund, J.R. 1998. Human whole-body copper metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 960S-964S.

Turnlund, J.R., Keyes, W.R., Peiffer, G.L., Scott, K.C. 1998. Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope <sup>65</sup>Cu. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1219-1225.

van den Berghe, P.V.E., Klomp, L.W.J. 2010. Posttranslational regulation of copper transporters. *J. Biol. Inorg. Chem.* 46, 15-37.

Williams, L.M., Oleksiak, M.F. 2008. Signatures of selection in natural populations adapted to chronic pollution. *BMC Evol. Biol.* 8, 282-294.

Wirgin, I., Roy, N.K., Loftus, M., Chambers, R.C., Franks, D.G., Hahn, M.E. 2011. Mechanistic basis of resistance to PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River. *Science* 331, 1322-1325.

Zimmer, A.M., Barcarolli, I.F., Wood, C.M., Bianchini, A. 2012. Waterborne copper exposure inhibits ammonia excretion and branchial carbonic anhydrase activity in euryhaline guppies acclimated to both freshwater and sea water. *Aquat. Toxicol.* 122-123, 172-80.

Zimnicka, A.M., Ivy, K., Kaplan, J.H. 2011. Acquisition of dietary copper: a role for anion transporters in intestinal apical copper uptake. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C588-C599.

Zimnicka, A.M., Maryon, E.B., Kaplan, J.H. 2007. Human copper transporter hCTR1 mediates basolateral uptake of copper into enterocytes: implications for copper homeostasis. *J. Biol. Chem.* 282, 26471-26480.



Table 1. Primers used to amplify the *P. vivipara* *CTR1* and *ATP7B* cDNA fragment, cloning and real-time PCR (qPCR) in the guppy *Poecilia vivipara*. CTR1: high-affinity copper transporter; ATP7B: copper-transporting ATPase; EF1- $\alpha$ : elongation factor 1- $\alpha$ .

Primer		Sequence (5' – 3')	Comment
Cloning			
CTR1	forward	TGTTCCCTATTGGCCGTTCTCTACG	PCR
CTR1	reverse	CGTCTTGTGCGTCTCCATCAGC	PCR
ATP7B	forward	GAAACAGAGAATGGATGAGGAG	PCR
ATP7B	reverse	TCGATGGCTACGTCTGTG	PCR
CTR1	forward	TGTTCCCTATTGGCCGTTCTCTACG	RACE 3'
CTR1	forward	TCCGCTACAACCTCCATGCCTCTACC	Nested 3'
CTR1	reverse	GTCTTGTGCGTCTCCATCAGCA	RACE 5'
CTR1	reverse	CTCCAGGTAGAGGCATGGAGTTG	Nested 5'
Real-time PCR			
CTR1	forward	TCCGCTACAACCTCCATGCCTCTACC	qPCR
CTR1	reverse	CTCCAGGTAGAGGCATGGAGTTG	qPCR
ATP7B	forward	GCCATGTTGGCCATCGCAGA	qPCR
ATP7B	reverse	TCGATGCCAATGCTGCTCAAGG	qPCR
$\beta$ -actin	forward	ATGTACGTTGCCATCCAGGCCGT	qPCR
$\beta$ -actin	reverse	ACCATCACCGGAGTCCATGACGA	qPCR
EF1- $\alpha$	forward	GGATGGCACGGAGACAACATGC	qPCR
EF1- $\alpha$	reverse	TCCTTGCGCTCAACCTTCCA	qPCR

Table 2. Identities between guppy *Poecilia vivipara* (Pv), cyprinodontiformes *Xiphophorus maculatus* (Xm) and killifish *Fundulus heteroclitus* (Fh), zebrafish *Danio rerio* (Dr) and Human (Hs) high-affinity copper transporter (CTR1) sequences. Values for amino acid identities are presented in the right-top and nucleotide identities in the left-bottom of the table.

	Pv CTR1	Xm CTR1	Fh CTR1	Dr CTR1	Hs CTR1
Pv CTR1		0.938	0.812	0.695	0.636
Xm CTR1	0.945		0.843	0.707	0.663
Fh CTR1	0.843	0.856		0.724	0.673
Dr CTR1	0.695	0.717	0.704		0.685
Hs CTR1	0.667	0.681	0.668	0.652	

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Whole-body and organ (gills, liver and gut) Cu content in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to freshwater (A) and salt water (B). Data are mean  $\pm$  standard error (n = 4-6). Different letters represent significant difference among treatments for each tissue (p <0.05, ANOVA, Duncan test).

Figure 2. Alignment of guppy *Poecilia vivipara* (Pv) high-affinity copper transporter (CTR1) amino acid predicted sequence with the cyprinodontiformes *Xiphophorus maculatus* (Xm) and killifish *Fundulus heteroclitus* (Fh), the zebrafish *Danio rerio* (Dr) and human (Hs) CTR1 sequences. The dots indicates identical amino acids in respect to *P. vivipara* CTR1. Dark and light gray boxes denote identical or similar amino acid in the alignment, respectively.

Figure 3. Phylogenetic tree based on the alignment of guppy *Poecilia vivipara* (Pv) CTR1 amino acid predicted sequence with the zebrafish *Danio rerio* (Dr), the medaka *Oryzias latipes* (Ol), human (Hs) and the cyprinodontiformes *Xiphophorus maculatus* (Xm) and the killifish *Fundulus heteroclitus* (Fh) CTR1 sequences. The human protein SLC31A2 was used as an out group.

Figure 4. Transcriptional levels of the copper-transporting ATPase (*ATP7B*) and high-affinity copper transporter (*CTR1*) in gills, liver and intestine of the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water and salt water (salinity 24 ppt).  *$\beta$ -actin* and *EF-1 $\alpha$*  were used as housekeeping genes (Ct average). Data are mean  $\pm$  standard error (n= 3-5). Different letters represent significant difference among groups (p <0.05, ANOVA, Newman-Keuls post hoc test).

Figure 5. Fold induction/repression of copper-transporting ATPase (*ATP7B*) and high-affinity copper transporter (*CTR1*) after 96-h waterborne exposure to Cu (5, 9, and 20 µg/L) relative to control (no Cu addition to the water ) in *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water or salt water (24 ppt). RT-qPCR analyses were done in gill, liver and intestine. \* Refers to significant differences (REST 2009 software Qiagen;  $p < 0.05$ ) among up- or down-regulated genes. The target gene expression was normalized by the expression levels of the non-regulated housekeeping genes *β-actin* and *EF-1α*.

Figure 1

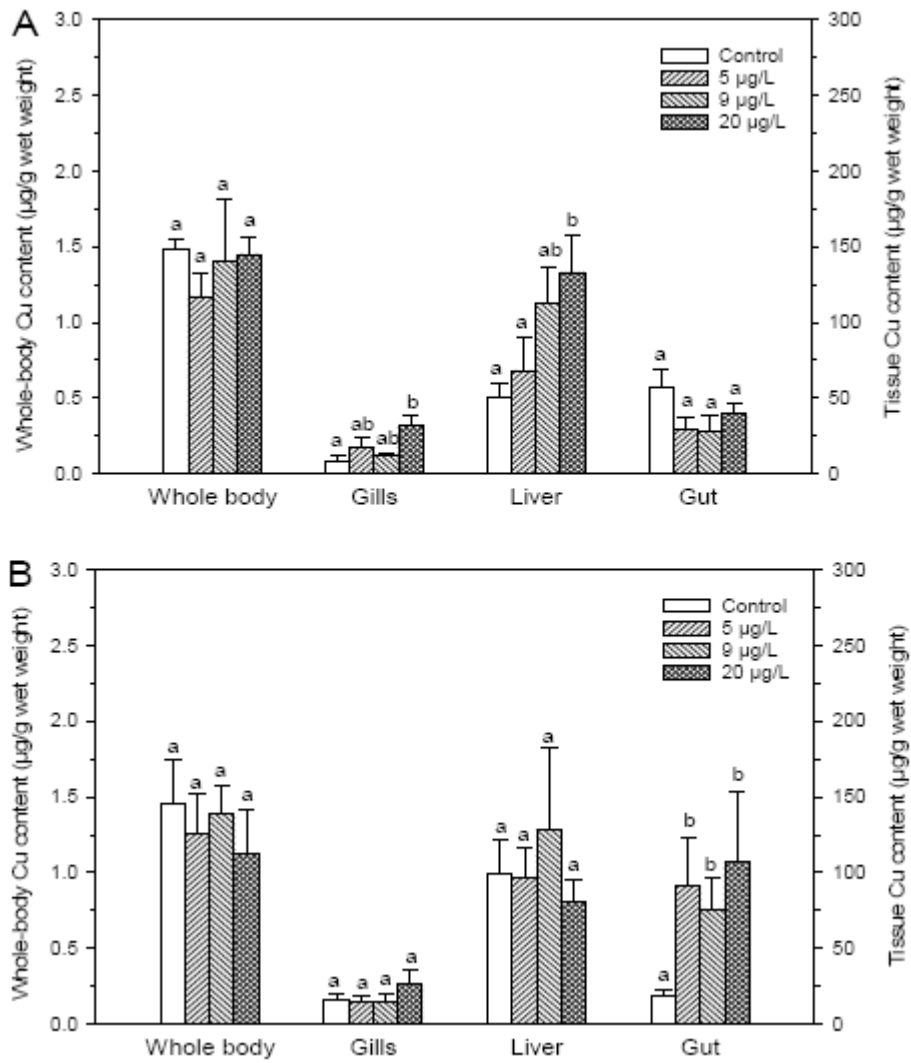


Figure 2

```

Pv_ctrl  MDHMAHKDHM  NHSAMATQHV  --HPSISTTT  VHDHGHGGD  GG-HAGHS-M  AMTFYFGYQN  VELLESQLVI  66
Xm_ctrl  ---...M...  .....D..  --.....  ....S--...  ..-.....-  .....  .....A....  61
Fh_ctrl  ---.D.MN..  .....DHSAM  D-.SQHA..  P  G...G--...  ..G.E..GG.  .....H.  .....TG...  64
Dr_ctrl  ..SSHSHH.V  EETT.PSPAS  GD.GGHL..  GNG.G-----  ----DHMMM.  Q.....K.  .....AG...  61
Hs_ctrl  ---.D.SH..  GM.Y.DSNST  MQPSHHHP..  SAS.S-----  ..GDSSMMM.  P.....FK.  .....G...  63

Pv_ctrl  NSPGEMFGAC  VGVFLLAVLY  EGMKIGREIL  PRRSQVNVRY  NSMPLPGADG  TLMETHKTV  GQRMLSPAHF  136
Xm_ctrl  .....  .....  ..L.....  L.....  .....  .....  .....  .....H...  131
Fh_ctrl  .....V...  I.....  ..L....V.  L.....X..  .....  .....  .....  .....  134
Dr_ctrl  .T...A...  I.....  ..L....V.  L..N.....  ...V.S..  .V.....  .....M...  131
Hs_ctrl  .TA...A...F  .A.....MF.  ..L..A..S.  L.K...SI..  ...V..PN.  .I.....  ..Q...FP..L  133

Pv_ctrl  LQTVLHIVQV  VVSYVLMMLVF  MTYNAYLCIA  VAAGAGMGYF  LFSWQKAVVV  DITEHCHX  194
Xm_ctrl  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  189
Fh_ctrl  ...F..I..  .....X  .....  .....  .....  .....  .....  192
Dr_ctrl  ...L...I..  ...F...  ...G...  ...L...  ...K...  .....  .....  189
Hs_ctrl  ...I...I..  .I..F...I.  ...G...  ...T...  ...K...  .....  .....  190

```

Figure 3

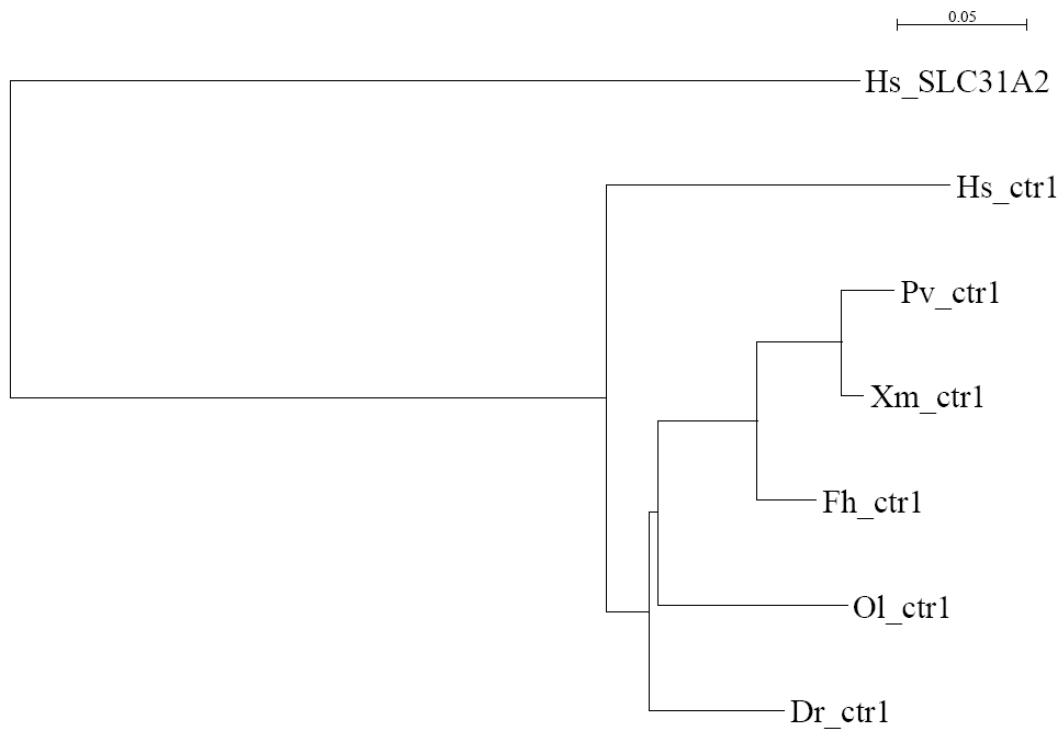


Figure 4

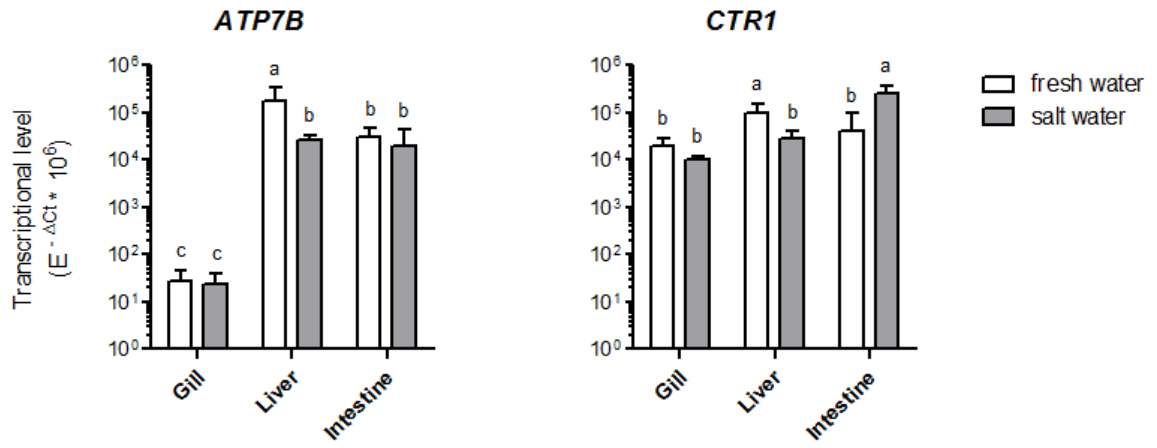
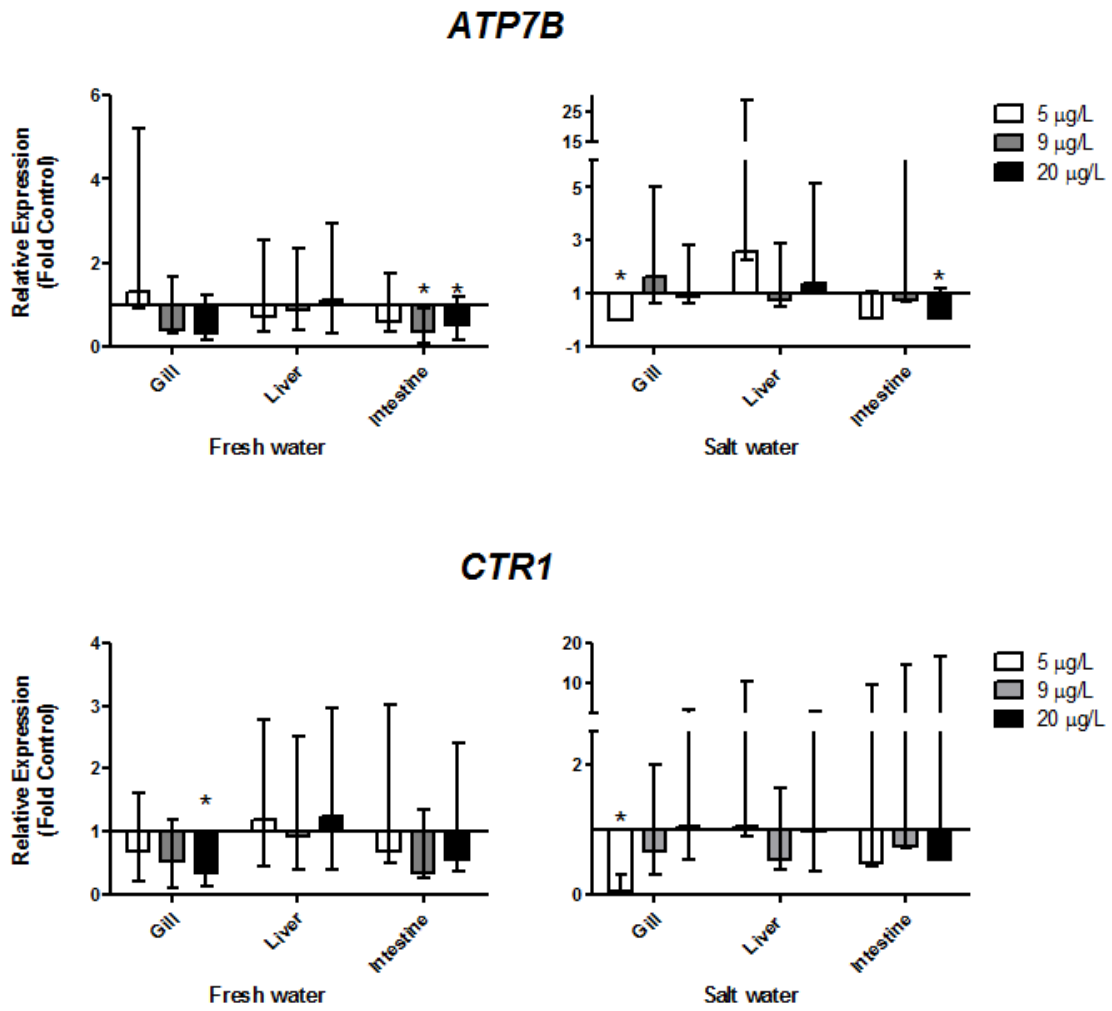




Figure 5



## 6. DISCUSSÃO GERAL

No caso de elementos que em baixas concentrações são essenciais para o funcionamento dos organismos e que em concentrações excessivas são tóxicos para a biota aquática, como é o caso do cobre, elemento testado no presente estudo, é de fundamental importância compreender os mecanismos envolvidos na homeostasia destes contaminantes. Peixes da ordem Ciprinodontiformes, como é o caso do guarú *Poecilia vivipara*, tem sido amplamente utilizados em estudos de toxicologia aquática, devido à sua alta tolerância a ambientes contaminados.

De acordo com Mackenzie et al. (2004), o CTR1 é uma proteína responsável pelo transporte de cobre e pode ser encontrada principalmente no intestino, fígado e órgãos relacionados ao sistema digestório do zebrafish *D. rerio*. Uma vez internalizado na célula, para que ocorra a movimentação desse metal, existem as Cu-ATPases, proteínas que se utilizam da energia advinda da hidrólise do ATP para realizar o transporte do metal através das membranas biológicas. Em mamíferos, após ser absorvido através da atividade da CTR1 no intestino, o cobre é, em seguida, distribuído no interior dos enterócitos até alcançar a ATP7A, a qual é responsável pela exportação do Cu da célula para o interior da corrente sanguínea. A ATP7A é expressa na maioria dos tecidos, porém a ATP7B tem sua expressão mais restrita, tendo sido demonstrada estar presente no intestino delgado. Porém, sua ocorrência e atividade são ainda pouco conhecidas (Lutsenko et al, 2007; Lönnerdal, 2008; Fontaine et al, 2010).

No presente estudo, experimentos foram realizados para identificar os genes que expressam os transportadores de cobre CTR1 e ATP7B, bem como avaliar a expressão diferencial desses genes em diferentes tecidos de *P. vivipara*, da salinidade de aclimação dos animais e do efeito da exposição aguda ao cobre dissolvido na água. Este estudo foi realizado com o guarú *P. vivipara* aclimatado à água doce e à água

salgada (salinidade 24). Por sua vez, os experimentos foram realizados utilizando-se diferentes concentrações de Cu, bem como outros órgãos (brânquias e intestino), além do fígado, para verificar se a regulação da transcrição do *CTR1* e da *ATP7B*, bem como a homeostasia do Cu podem ser alteradas pela exposição ao metal dissolvido na água.

Os resultados obtidos levaram-nos a identificar duas novas sequências para os genes do *CTR1* e da *ATP7B* em *P. vivipara*. Estas sequências apresentaram altos valores de identidade com as sequências destes transportadores em outras espécies de peixes, indicando que os genes envolvidos na expressão das proteínas transportadoras de Cu são bastante conservados e difundidos entre os vertebrados. A análise quantitativa da expressão destes genes indicou que o *CTR1* e a *ATP7B* se expressam em maior nível no fígado de guarús aclimatados à água doce. Por sua vez, a maior expressão do *CTR1* em guarús na água salgada é encontrada no intestino, enquanto que a expressão da *ATP7B* nestes peixes é similar no fígado e no intestino. Esta expressão tecido-específica observada em *P. vivipara* também já foi relatada para o zebrafish *Dario rerio* aclimatado à água doce (Craig et al., 2009). No entanto, os resultados do presente estudo reforçam ainda a influência da salinidade de aclimação nos níveis de expressão dos transportadores de Cu em *P. vivipara*.

Com relação à exposição ao Cu, foi observado um aumento na expressão do *CTR1* e da *ATP7B* no fígado de *P. vivipara* exposto a 20 µg/L de cobre dissolvido. Este resultado está totalmente em acordo com aquele relatado por Craig et al. (2009), que demonstraram um aumento na expressão do *CTR1* no fígado e da *ATP7A* nas células intestinais e hepáticas do zebrafish *D. rerio* após 21 dias de exposição a 12 µg/L de Cu dissolvido na água doce. O aumento da expressão gênica em *P. vivipara* foi dependente da concentração de Cu na água e acompanhado por um aumento da acumulação hepática do metal. Estes resultados sugerem, portanto, que o excesso de Cu absorvido pelo peixe pode estar sendo estocado no fígado, em função do aumento da expressão

dos transportadores do metal (CTR1 e ATP7B) neste órgão, visando à manutenção de níveis circulantes adequados de cobre no animal.

Um padrão de acumulação de Cu dependente da concentração do metal na água também foi observado nas brânquias de guarús aclimatado à água doce e no intestino de guarús aclimatados à água salgada. A expressão do CTR1 e da ATP7B foi significativamente reduzida nas brânquias dos guarús de água doce expostos ao Cu, enquanto a expressão destes genes foi fortemente diminuída no intestino dos guarús de água salgada expostos ao metal. É importante notar que foi observada uma diminuição na expressão da *ATP7A* no intestino do *D. rerio* quando exposto a concentrações maiores que 12 µg/L de Cu dissolvido na água doce. Assim, os resultados relatados no presente estudo indicam claramente que a regulação da transcrição do *CTR1* e da *ATP7B* é tecido-específica, uma vez que ela ocorre de maneira inversa nas brânquias e no fígado de *P. vivipara* aclimatado à água doce. Neste caso, a expressão dos transportadores de Cu é inibida com o aumento do conteúdo do metal nas brânquias e aumentada com o aumento do conteúdo de Cu no fígado.

Por sua vez, os resultados combinados de maior expressão dos transportadores de Cu (CTR1 e ATP7B) e de maior acumulação deste metal no fígado de guarús expostos ao Cu em água doce reforçam o importante papel deste órgão na regulação da homeostasia do Cu em vertebrados. De fato, apesar de ter sido observada uma acumulação de Cu nas brânquias e no fígado de guarús aclimatados à água doce, nenhuma alteração significativa no conteúdo corporal de Cu foi observada nestes peixes após exposição ao metal. Além disso, a ausência de aumento do conteúdo corporal de Cu em guarús expostos ao metal na água salgada indica que a resposta gênica apresentada por *P. vivipara* pode estar envolvida no mecanismo de manutenção da homeostasia do Cu nesta espécie quando aclimatada a este ambiente. Neste caso, foi observada uma redução marcante na expressão do CTR1 e da ATP7B no intestino

destes peixes, a qual foi associada em paralelo com um aumento no conteúdo de Cu intestinal após exposição ao metal.

## **7. CONCLUSÃO GERAL**

O presente estudo mostra que as sequências dos genes *CTR1* e *ATP7B* são altamente conservadas, além disso, os referidos genes se expressam em brânquias, fígado e intestino de *P. vivipara*, de forma tecido-específica e dependente da salinidade em que os peixes estão aclimatados e da exposição aguda ao cobre dissolvido na água. Os resultados combinados de expressão gênica e acumulação de Cu (corporal e tecidual) indicam claramente que a homeostasia corporal do metal é mantida, pelo menos em parte, pela limitação da absorção de Cu através de uma redução da expressão dos transportadores do metal (*CTR1* e *ATP7B*) nas brânquias e no intestino de guarús aclimatados à água doce e à água salgada, respectivamente. Por sua vez, o excesso CE cobre absorvido é acumulado no fígado associado à um aumento da expressão dos transportadores de cobre em guarús aclimatados à água doce.

## **8. PERSPECTIVAS**

As identificações das novas sequências para estes genes em *P. vivipara* dão suporte a futuros estudos com os peixes Ciprinodontiformes como modelo em toxicologia ambiental.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral, M.C., Bonecker, A.C.T., Ortiz, C.H.D. 2001. Activity determination of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase and Mg<sup>++</sup>-ATPase enzymes in the gill of *Poecilia vivipara* (Osteichthyes, Cyprinodontiformes) in different salinities. Braz. Arch. Biol. Technol. 44,1-6.

Araújo, F.G., Peixoto, M.G., Pinto, B.C.T., Teixeira, T.P. 2009. Distribution of guppies *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) and *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) along a polluted stretch of the Paraíba do Sul River, Brazil. Braz. J. Biol. 69, 41-48.

Bankier, A. 1995. Menkes disease. J. Med. Genet. 32, 213-215.

Bidone, E.D., Laybauer, L., Castilhos, Z.C., Maddock, J.L. 2001. Environmental risk increase due to heavy metal contamination caused by a copper mining activity in Southern Brazil. An. Acad. Bras. Ciênc. 73, 277-286.

CONAMA. 2005. Resolução nº 357 de 11 de março de 2005, que dispõe sobre diretrizes de enquadramento dos corpos d'água e dá outras providências.

<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> (acessado em Dezembro de 2012).

CONAMA. 2008. Resolução nº 396 de 03 de abril de 2008, que dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> (acessado em Dezembro de 2012).

Craig, P.M., Wood, C.M., Mclelland, G.B. 2010. Water chemistry alters gene expression and physiological end points of chronic waterborne copper exposure in zebrafish, *Danio rerio*. Environ. Sci. Technol. 44, 2156-2162.

Craig, P.M., Galus, M., Wood, C.M., Mclelland, G.B. 2009. Dietary iron alters waterborne copper-induced gene expression in soft water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 296, 362-373.

Gomes-Jr, J.L. 2006. Variação na forma e tamanho corporal em *Poecilia vivipara* (Teleostei, Poeciliidae) em lagoas da região norte fluminense. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. 42 p.

Grosell, M., Blanchard, J., Brix, K.V., Gerdes, R. 2007. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. Aquat. Toxicol. 84, 162-172.

Guo, Y., Smith, K., Lee, J., Thiele, D.J., Petris, M.J. 2004. Identification of methionine-rich clusters that regulate copper stimulated endocytosis of the human *CTR1* copper transporter. J. Biol. Chem. 279, 17428-17433.

Ip, V., Liu, J.J., Mercer, J.F.B., McKeage, M.J. 2010. Differential expression of ATP7A, ATP7B and CTR1 in adult rat dorsal root ganglion tissue. Mol. Pain 6, 53-63.

Jesus, T.B., Carvalho, C.E.V. 2008. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecol. Bras.* 12, 680-693.

Kamunde, C., Clayton, C., Wood, C.M. 2002. Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R69-R78.

Kaplan, J.H., Lutsenko, S. 2009. Copper transport in mammalian cells: Special care for a metal with special needs. *J. Biol. Chem.* 284, 25461-25465.

Kuo, Y.M., Gybina, A.A., Pyatskowitz, J.W., Gitschier, J., Prohaska, J.R. 2006. Copper transport protein (Ctr1) levels in mice are tissue specific and dependent on copper status. *J. Nutr.* 136, 21-26.

Lee, J.A., Marsden, I.D., Glover, C.N. 2010. The influence of salinity on copper accumulation and its toxic effects in estuarine animals with differing osmoregulatory strategies. *Aquat. Toxicol.* 99, 65-72.

Lee, J., Penha, M.M.O., Nose, Y., Thiele, D.J. 2002. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J. Biol. Chem.* 277, 4380-4387.

Linder, M.C., Hazegh-Azam, M. 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 797S-811S.



- Lönnerdal, B. 2008. Intestinal regulation of copper homeostasis: a developmental perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 846S-850S.
- Lutsenko, S., Barnes, N.L., Bartee, M.Y., Dmitriev, A.O.Y. 2007a. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol. Rev.* 87, 1011-1046.
- Lutsenko, S., Leshane, E.S., Shinde, U. 2007b. Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Arch. Biochem. Biophys.* 463, 134-148.
- Mackenzie, N.C., Brito, M., Reyes, A.E., Allende, M.L. 2004. Cloning, expression pattern and essentiality of the high-affinity copper transporter 1 (CTR1) gene in zebrafish. *Gene* 328, 113-120.
- Madsen, E.C., Gitlin, J.D. 2008. Zebrafish mutants calamity and catastrophe define critical pathways of gene-nutrient interactions in developmental copper metabolism. *PLoS Genet.* 4(11): e1000261.
- Mercer, J.F.B. 1998. Menkes syndrome and animal models. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1022S-1028S.
- Mercer, J.F.B., Llanos, R.M. 2003. Molecular and cellular aspects of copper transport in developing mammals. *J. Nutr.* 133, 1481S -1484S.
- Minghetti, M., Leaver, M.J., George, S.G. 2010. Multiple Cu-ATPase genes are differentially expressed and transcriptionally regulated by Cu exposure in sea bream, *Sparus aurata*. *Aquat. Toxicol.* 97, 23-33.

Mufti, A. R.; Bursteinb, E.; Ducketta, C. S.2007. XIAP: Cell death regulation meets copper homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 463, 2, 168–174.

Oleksiak, M.F. 2010. Genomic approaches with natural fish populations. *J. Fish Biol.* 76, 1067-1093.

Petris, M.G, Smith, K., Lee, J., Thiele, D.J. 2003. Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J. Biol. Chem.* 278, 9639-9646.

Predki P.F., Sarkar, B. 1992. Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J. Biol. Chem.* 267, 5842-5846.

Prohaska, J.R. 2008. Role of copper transporters in copper homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 826S-829S.

Santore, R.C., Di Toro, D.M., Paquin, P.R., Allen, H.E., Meyer, J.S. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2397-2402.

Turnlund, J.R. 1998. Human whole-body copper metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 960S-964S.

Turnlund, J.R., Keyes, W.R., Peiffer, G.L., Scott, K.C. 1998. Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope <sup>65</sup>Cu. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1219-1225.

van den Berghe, P.V.E., Klomp, L.W.J. 2010. Posttranslational regulation of copper transporters. *J. Biol. Inorg. Chem.* 46, 15-37.

Zimnicka, A.M., Ivy, K., Kaplan, J.H. 2011. Acquisition of dietary copper: a role for anion transporters in intestinal apical copper uptake. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C588-C599.

Zimnicka, A.M., Maryon, E.B., Kaplan, J.H. 2007. Human copper transporter hCTR1 mediates basolateral uptake of copper into enterocytes: implications for copper homeostasis. *J. Biol. Chem.* 282, 26471-26480.

Zhou, B., Gitschier, J. 1997. hCTR1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7481-7486.