



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas



Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Análise da expressão gênica e transcriptômica em *Hyphessobrycon luetkenii* na área de influência das Minas do Camaquã (Caçapava do Sul, RS) como indicador adaptativo frente à contaminação por metais

MSc. Sandra Isabel Moreno Abril

Orientador:

Dr. Adalto Bianchini

Rio Grande

Brasil

2018

Agradecimentos

Gratidão infinita à vida por todas as oportunidades, os aprendizados, os lugares que conheci e os seres que me acompanharam durante estes quatro anos de caminhada.

Ao Adalto pela liberdade que me deu de construir e desenvolver as minhas próprias ideias.

Ao Arne pelo seu apoio desinteressado e incondicional.

Aos colegas, tanto da Alemanha quanto do Brasil, pela parceria, a construção de ideias, além da companhia e as boas risadas sempre, especialmente a Camila Dalmolin, Laura Marangoni, Joseane Marques, Samuel Faria, Vinicius Dias, Mariana Lauer, Gilson, Guenole Le Pennec, Stefan Dennenmoser, Ela Iwaszkiewicz.

A minha família pelo amor desde sempre, mesmo na distância, Armando Moreno, Diana Abril, Ginna Moreno, Carolina Moreno, Santi, Alejo, Migue e Juanjo.

Aos amigos que, quando estamos longe de casa, são nossa família: Lovane Wildner , Andre Coutinho, Elio e Neusa Sá, Lea Terra, Laura Marangoni, Joseane Marques, Samuel Faria, Lupe Studzinski, Daniela Volcan, Liane do Artico, Michele Castro, Mingau e Margó.

Aos professores, que de uma forma ou de outra, contribuíram e estiveram sempre abertos a me escutar, especialmente Luís Fernando Marins, Maíra Proietti e Fábio Maciel.

E finalmente, mas absolutamente importante, a minha pequena e amada família colombo-hispano-brasileira pela companhia, o amor, a paciência vocês Juan e Lince... que são meu lar e minha felicidade... eu amo vocês.

Sumário

Resumo Geral	1
Abstract.....	2
1 Introdução Geral.....	3
1.1 Contaminação por metais	3
1.2 Metais e a importância da sua regulação nos organismos.....	3
1.2.1 Metaloproteínas.....	4
1.3 Metabolismo do Cobre.....	5
1.3.1 Fator de Transcrição Responsivo a Metais 1 (MTF1)	6
1.3.2 Metalotioneínas (MTs).....	7
1.3.3 Transportador de cobre tipo 1 (CTR1)	8
1.3.4 ATPase transportadora de cobre tipo P (ATP7).....	8
1.4 Respostas gênicas dos organismos a ambientes contaminados	9
1.4.1 Contaminação, estresse e aclimação em peixes	9
1.4.2 Expressão gênica e evolução molecular	11
1.5 RNaseq em peixes	12
1.5.1 Aplicações do RNaseq em toxicologia aquática e evolução em peixes	14
1.6 <i>Hyphessobrycon luetkenii</i> e as Minas do Camaquã	14
1.6.1 <i>Hyphessobrycon luetkenii</i>	14
1.6.2 Minas do Camaquã como um cenário natural para o estudo da adaptação evolutiva	15
2 Objetivos	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos.....	17
Capítulo 1 Metal accumulation and gene expression in the freshwater fish <i>Hyphessobrycon luetkenii</i> long-term adapted to metal enriched environment.....	18
Capítulo 2 Expression of genes related to metal metabolism in the freshwater fish <i>Hyphessobrycon luetkenii</i> living in a historically contaminated area associated with copper mining	38
Capítulo 3 Transcriptome analysis in aggregations of the freshwater fish <i>Hyphessobrycon luetkenii</i> inhabiting environments historically contaminated with metal mixtures.....	70
Discussão Geral	88
Conclusões Gerais	97
Bibliografia Geral.....	98

1 **Análise da expressão gênica e transcriptômica em *Hyphessobrycon luetkenii* na**
2 **área de influência das Minas do Camaquã (Caçapava do Sul, RS) como indicador**
3 **adaptativo frente à contaminação por metais,**

4 **Resumo Geral**

5
6
7 A atividade de mineração do cobre nas Minas do Camaquã (Caçapava do Sul, RS)
8 ocorreu por mais de um século (~1870-1996) e promoveu o aporte de misturas
9 complexas de metais em altas concentrações para o Arroio João Dias. Portanto, as
10 espécies que habitam este ambiente têm sido submetidas por gerações à influência dos
11 resíduos da mineração. Atualmente, altos níveis de metais ainda são detectados nas
12 águas do Arroio João Dias, onde habita o lambari *Hyphessobrycon luetkenii*. Devido à
13 presença de diversos agrupamentos deste peixe tanto em áreas contaminadas quanto em
14 áreas não contaminadas do Arroio João Dias, o presente estudo teve como objetivo
15 identificar mecanismos de regulação transcricional relacionados com o
16 estabelecimento e a tolerância a metais de *H. luetkenii*, através de experimentos de
17 translocação. Os resultados obtidos evidenciam que os agrupamentos que habitam
18 naturalmente locais contaminados e não contaminados do Arroio João Dias apresentam
19 diferenças nos níveis basais de expressão de diversos genes. Estes resultados
20 demonstram ainda que muitos dos genes relacionados com o equilíbrio iônico e
21 metabolismo de esteroides, apresentaram diferenças e foram regulados ativamente nos
22 grupos de peixes translocados (Capítulo 3). Por outro lado, a análise temporal da
23 expressão de genes relacionados com o metabolismo de Cobre em diversos tecidos
24 permitiu se ter uma visão mais sistêmica dos processos regulatórios envolvidos
25 (Capítulos 1 e 2), facilitando assim a compreensão destes processos em um nível
26 orgânico. Considerando o conjunto dos resultados obtidos, pode-se inferir que a
27 plasticidade fenotípica e os mecanismos regulatórios em nível transcricional estão
28 implicados na sobrevivência e no sucesso ecológico de *H. luetkenii* em ambientes
29 historicamente contaminados por misturas de metais.

30
31 **Palavras-chave:** contaminação por metais, transcriptoma, expressão genética.

33 **Abstract**

34
35 Copper mining in the Minas do Camaquã district (Caçapava do Sul, RS) was active for
36 more than a century (~1870-1996), thus releasing great amounts of complex mixtures of
37 metals in the João Dias creek. Therefore, species inhabiting this environment, such as
38 the fish *Hyphessobrycon luetkenii*, have been exposed over generations to metal
39 contamination. Nowadays, high levels of metals are still found in the João Dias creek.
40 Due to the presence of aggregates of these fish living in contaminated and non
41 contaminated sites of the João Dias creek, the present study aimed to identify
42 mechanisms of transcriptional regulation related with the establishment and metal
43 tolerance of *H. luetkenii*, through field translocation experiments. Our results evidence
44 that fish aggregates from both sites show great differences in the basal level of
45 expression of several genes. Furthermore, they indicate that many of these genes related
46 with the ionic equilibrium and steroid metabolism, were actively regulated in
47 translocated fish (Chapter 3). On the other hand, the temporal analysis of the expression
48 of specific genes of Copper metabolism in several fish tissues allowed us to have a
49 systemic view of the regulatory processes (Chapters 1 and 2). This helped us to better
50 understand these processes in an organismic level. Altogether, our findings indicate that
51 phenotypic plasticity and transcriptional regulatory mechanisms are implicated in the
52 survival and ecological success of the fish *H. luetkenii* living in environments
53 historically contaminated with metal mixtures.

54
55 **Keywords:** metal contamination, transcriptome, gene expression

67 **1 Introdução Geral**

68 **1.1 Contaminação por metais**

69

70 A contaminação ambiental é um fenômeno que aumenta exponencialmente desde a
71 Revolução Industrial (Förstner and Wittmann, 2012). Devido aos avanços tecnológicos
72 e ao crescimento da população humana, o número de ecossistemas que ainda estão
73 livres de qualquer tipo de contaminação é cada vez menor. De fato, a cada dia são
74 produzidas e liberadas no ambiente substâncias e misturas de contaminantes cada vez
75 mais complexas. Apesar disso, os efeitos após exposição continuada a contaminantes
76 por muitas gerações tem sido pouco estudados.

77 Os metais constituem um grupo de contaminantes que podem ser considerados como
78 sendo clássicos, já que altos níveis destes nos corpos da água podem se associar as com
79 a composição própria do solo (Förstner and Wittmann, 2012) e desde épocas pré-
80 históricas a humanidade tem extraído e utilizado estes recursos naturais para o seu
81 desenvolvimento. Portanto, a exploração dos metais tem sido uma das primeiras
82 atividades a gerar contaminação ambiental, fato que nos permite atualmente avaliar os
83 efeitos deste tipo contaminação desde uma perspectiva evolutiva.

84 Devido ao fato de que os peixes compartilham processos metabólicos e fisiológicos com
85 outros grupos de vertebrados (Santos et al., 2010), estes são considerados importantes
86 indicadores biológicos, que dão conta da qualidade do ecossistema e podem ser úteis
87 ferramentas para monitoramento e proteção ambiental e humana. Porém, generalizar
88 repostas de sensibilidade e/ou resistência aos metais não é uma tarefa simples, já que
89 muitos destes metais fazem parte do próprio organismo e portanto, existem diferenças
90 de tolerância próprias à cada espécie (Eyckmans et al., 2012).

91

92 **1.2 Metais e a importância da sua regulação nos organismos**

93

94 Dentre os elementos químicos, os metais são um grande grupo de substâncias com
95 características químicas específicas. Alguns destes metais que fazem parte dos
96 organismos em pequenas quantidades são denominados como elementos essenciais já
97 que estão presentes nos diversos tecidos do organismo e sintomas de deficiência

98 aparecem quando estão em quantidades abaixo do necessário (Förstner and Wittmann,
99 2012).

100

101 **1.2.1 Metaloproteínas:** Os metais essenciais têm grande importância para os
102 organismos, dentre outros devido à sua capacidade de oxidação-redução (redox). Estes
103 elementos são biologicamente ativos, fazendo parte de proteínas (metaloproteínas) que
104 participam de uma grande quantidade de funções biológicas, tais como enzimas,
105 transportadores e transdutores de sinais (Cowan, 1997).

106 Os metais essenciais se ligam ou se conjugam nas metaloproteínas, agindo no sítio ativo
107 ou estabilizando sua estrutura proteica. Porém o excesso destes elementos pode ser
108 tóxico ao organismo (Zhao et al., 2014). Portanto, todos os organismos desenvolveram
109 mecanismos para regular os níveis homeostáticos dos metais, tanto para situações de
110 excesso como de deficiência. É reconhecido que os níveis homeostáticos dos metais
111 estão diretamente relacionados às respostas de estresse oxidativo em diversos tipos
112 celulares (Giedroc et al., 2001).

113 Sendo assim, o transporte de íons metálicos é de grande importância para a
114 sobrevivência dos organismos e conseqüentemente, diversos mecanismos de controle
115 têm evoluído paralelamente, tais como as proteínas transportadoras e as proteínas de
116 armazenamento (Zhao et al., 2014). Dentre os metais essenciais, podem ser destacados o
117 zinco (Zn), o ferro (Fe) e o cobre (Cu), descritos a seguir.

118

119 **Zinco (Zn):** O Zn é um dos elementos essenciais mais requeridos pelo corpo
120 humano (Förstner and Wittmann, 2012), é um elemento essencial para o funcionamento
121 de mais de 300 enzimas e para manter a integridade estrutural de mais de 2000 fatores
122 de transcrição (Zhao et al., 2014). Mudanças nos níveis ambientais de Zn influenciam
123 ativamente diversas atividades biológicas, via regulação transcricional (Choi and
124 J. Bird, 2014). As análises de transcriptoma têm permitido demonstrar como diversos
125 processos alterados pelo Zn são regulados por poucos fatores de transcrição. Dentre
126 estes, destaca-se o *Fator de Transcrição Responsivo a Metais I* (MTF), principal
127 regulador da expressão das metalotioneínas. Por outro lado, cabe destacar que estudos
128 com o *Danio rerio* têm demonstrado que, com o decorrer do tempo, as mudanças

129 transicionais diminuem, sugerindo que estes organismos se aclimatam gradualmente a
130 níveis elevados de Zn na água (Zhao et al., 2014).

131 **Ferro (Fe):** O Fe é o elemento de transição mais abundante (Förstner and
132 Wittmann, 2012), está presente em praticamente todos os organismos e está envolvido
133 em diversas funções básicas, tais como transporte de oxigênio, respiração celular e
134 síntese de DNA (Zhao et al., 2014). Nos sistemas biológicos o Fe pode se encontrar em
135 três estados de oxidação (II, III e IV), a incorporação excessiva de Fe pode resultar
136 toxica devido a sua habilidade de catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio
137 (ROS) pela reação de Fenton (Sevcikova et al., 2011)

138 **Cobre:** O Cobre é um micronutriente essencial presente em todos os
139 organismos. É componente de muitas proteínas tanto funções estruturais como
140 enzimáticas, dentre as que se destacam a Cu-Zn SOD, a citocromo oxidase e a
141 ceruloplasmina (Sevcikova et al., 2011). Assim como o Fe, é um metal com atividade
142 redox, o que também lhe confere um alto potencial de toxicidade (Zhao et al., 2014).

143

144 **1.3 Metabolismo do Cobre (Cu)**

145 O Cu é um metal de transição essencial tanto para procarionotas como eucariotas. Com
146 base nas suas interações, dois grandes grupos de proteínas dependentes de Cu podem
147 ser identificadas. A primeira classe são as enzimas dependentes de Cu, cuja função
148 enzimática está baseada em dois estados de oxidação deste metal (Cu^{2+} e Cu^+). A
149 segunda classe de enzimas são aquelas que tem o Cu como elemento estrutural, e podem
150 agir como sensores iônicos de Cu, além de ter um papel importante na sinalização do
151 Cu iônico (Storey e Storey, 2000). As enzimas dependentes de Cu estão envolvidas em
152 processos biológicos tais como fosforilação oxidativa (citocromo C oxidase), atividade
153 antioxidante (superóxido dismutase), formação de tecido conjuntivo (lisil oxidase),
154 funções neurológicas (dopamina beta-hidroxilase) e metabolismo do ferro
155 (celuroplasmina) (Sharp, 2003).

156 Com base no acima exposto, as quantidades intracelulares de Cu devem ser
157 cuidadosamente controladas, devido a seus potenciais efeitos tóxicos como a geração de
158 ROS via ciclo redox (Balamurugan e Schaffner, 2006). Sendo assim, o metabolismo
159 endógeno do Cu pode ser dividido em três grandes processos: incorporação, distribuição
160 intracelular e excreção (Zhao et al., 2014).

161 Em peixes, a principal forma de aquisição do Cu é via dieta. Apesar disso, uma alta taxa
162 de transporte deste metal através da membrana do epitélio branquial faz com que os
163 peixes estejam especialmente susceptíveis à toxicidade pelo Cu dissolvido na água
164 (Santos et al., 2010). Sendo assim, as duas principais vias para incorporação de Cu em
165 peixes são a brânquia e o intestino, o que faz destes órgãos interessantes alvos para o
166 estudo dos mecanismos homeostáticos (Leung et al., 2014). As principais proteínas
167 envolvidas na incorporação de Cu são os transportadores CTR (CTR1 e CTR3, com
168 diferentes mecanismos de ação). Após a entrada do Cu na célula, este se liga a uma
169 grande variedade de chaperonas citosólicas e, posteriormente, é transportado para locais
170 específicos dentro da célula (Zhao et al., 2014). Diversos fatores de transcrição regulam
171 a expressão das proteínas transportadoras de Cu, via interações com as regiões
172 promotoras de DNA. O Cu que se liga a estes fatores de transcrição é acompanhado por
173 arranjos estruturais que promovem ou reprimem as interações do DNA, ativando ou
174 bloqueando a expressão de proteínas transportadoras deste metal. Estas proteínas
175 transportadoras promovem a transferência do metal pela baixa afinidade dos locais de
176 ligação ou por terem poucos ligantes com uma maior afinidade. As duas estratégias
177 permitem não somente reter o metal, mas também transferi-lo sob condições
178 apropriadas (Rubino e Franz, 2012). É sabido que a funcionalidade destas proteínas que
179 participam na distribuição intracelular do Cu é determinada pelo estado de oxidação do
180 Cu (Storey e Storey, 2000).

181

182 **1.3.1. Fator de Transcrição Responsivo a Metais 1 (MTF-1)**

183 A expressão genética é regulada em diferentes níveis, os quais devem ser considerados
184 quando se pretende avaliar sua evolução (Chen e Rajewsky, 2007). Portanto, se precisa
185 compreender como os fatores de regulação individuais e específicos interagem com os
186 genes alvo. Os fatores de transcrição, constituem uma grande família de moléculas que
187 regulam a expressão genética nos organismos pluricelulares. Esta regulação pode ser
188 tanto positiva quanto negativa, e depende do trabalho cooperativo entre os diversos
189 fatores de transcrição (Hobert, 2008). Devido à importância destes fatores, estes são
190 regulados por processos pós-transcripcionais como fosforilação, processamento e
191 localização. Contudo, as funções dos fatores de transcrição devem ser vistas como um
192 processo integrado e combinado com outras moléculas (Spitz e Furlong, 2012). É

193 importante salientar que muitos fatores de transcrição são altamente conservados
194 evolutivamente (Chen e Rajewsky, 2007).

195 O MTF-1 é um fator de transcrição com domínios de Zn, que controla a expressão das
196 metalotioneínas e outros componentes envolvidos na homeostasia dos metais, seus seis
197 domínios de ligação a Zn são altamente conservados entre os vertebrados (Andrews,
198 2001). Em altas concentrações de Cu, o MTF-1 ativa as metalotioneínas para proteger a
199 célula. Já em baixas concentrações de Cu, este fator ativa o transportador CTR1B, com
200 a finalidade de incorporar Cu na célula (Balamurugan e Schaffner, 2006).

201 O MTF-1 pode ser ativado pela ligação do Zn (II), se transloucar para o núcleo e ativar
202 a expressão dos genes que contem elementos de resposta MREs, adicionalmente a
203 ligação do MTF-1 ao DNA pode ser estimulada pelo Cd (II) ou pelo estresse oxidativo
204 (Giedroc et al., 2001).

205

206 **1.3.2. Metalotioneínas (MTs)**

207 MTs são proteínas de baixo peso molecular, que estão diretamente envolvidas em
208 processos de detoxificação de metais uma vez que evitam o estresse oxidativo derivado
209 da exposição a estes elementos. A produção de MTs é diretamente proporcional à
210 exposição a metais (Nunes et al., 2014). Devido ao seu elevado conteúdo de cisteínas,
211 estas podem se ligar a metais tóxicos implicados no balanço redox e sequestrar radicais
212 livres. As MTs podem estocar Cu, mas não tem a capacidade de eliminá-lo da célula
213 (Balamurugan e Schaffner, 2006).

214 Sob condições de exposição a metais, a expressão das MTs é regulada em nível
215 transcricional por fatores de transcrição responsivos a metais, que se ligam ao gene das
216 MTs na região promotora para favorecer a sua expressão (Balamurugan e Schaffner,
217 2006). Os elementos de resposta, ligados ao MTF-1 são responsivos a diversos metais
218 dentre eles o Zn, da presença destes elementos de resposta depende a transcrição dos
219 genes de MTs em muitos tipos celulares. Além disso, sugere-se que o MTF-1 regula
220 também a transcrição de diversos genes implicados no sistema de defesa antioxidante,
221 adicionalmente tem sido sugerido que o domínio de reconhecimento de DNA do gene
222 que codifica para MTF-1 é altamente conservado evolutivamente (Dalton et al., 2000).

223 **1.3.3. Transportador de cobre tipo 1 (CTR1)**

224 Em nível celular, as proteínas de transporte devem ser direcionadas para o local
225 adequado e permanecer ali o tempo necessário para cumprir a sua função (La Fontaine
226 and Mercer, 2007). Desde leveduras até mamíferos, o Cu é adquirido por proteínas
227 transportadoras de membrana, como a família de transportadores do tipo CTR, que tem
228 um característico grupamento amino terminal rico em metionina, ao que se liga o Cu
229 extracelular (Leung et al., 2014). O transportador CTR1 com alta afinidade pelo Cu é o
230 principal responsável pela sua incorporação. Por sua vez, o CTR2 é um transportador
231 com menor afinidade pelo Cu e é o principal transportador implicado na descarga deste
232 metal a partir das vesículas (Zhao et al., 2014). O Cu é incorporado a partir da dieta via
233 intestino delgado e distribuído no organismo (Festa and Thiele, 2011). Em mamíferos,
234 tem sido demonstrado que o transportador CTR1, localizado especialmente em células
235 do intestino delgado, tem preferência pelo Cu(I), enquanto o transportador de metais
236 divalentes DMT1 tem preferência pelo Cu(II). O Cu presente na dieta, geralmente está
237 na forma Cu(II) portanto deve ser transformado na forma reduzida Cu(I) pela redutase,
238 para ser assimilado pelo intestino (Sharp, 2003).

239 O fígado é o principal responsável pela regulação do Cu no organismo. A incorporação
240 deste metal nas células é feita principalmente pelos transportadores CTR1 e DMT1. Por
241 sua vez, as pequenas moléculas, tais como a glutathiona (GSH) e as metalotioneínas, se
242 ligam ao Cu para promover a sua estocagem e detoxificação. As metalochaperonas se
243 ligam ao Cu para promover a sua distribuição para locais específicos dentro da célula
244 (La Fontaine and Mercer, 2007). Já a COX17 auxilia a transferência de Cu no espaço da
245 membrana mitocondrial para sua metilação e sua ensamblagem na citocromo c oxidase,
246 enquanto a ATOX1 transfere o Cu para as Cu-ATPases (ATP7A e ATP7B), que
247 conduzem este para vias secretórias para fora da célula (La Fontaine e Mercer, 2007).

248

249 **1.3.4. ATPase transportadora de cobre tipo P (ATP7)**

250 Embora as metalotioneínas consigam estocar o Cu, estas não são as encarregadas de
251 eliminar o excesso deste metal da célula. Em organismos pluricelulares, os
252 transportadores de Cu tipo ATP7 redistribuem o Cu sem afetar as quantidades corporais
253 do metal (Balamurugan e Schaffner, 2006). Por sua vez, as Cu-ATPases (ATP7A e
254 ATP7B) são proteínas especializadas no transporte de Cu, mediando a translocação
255 deste metal através das membranas celulares. Os seus padrões de expressão são

256 complementares, sendo que a ATP7A é amplamente expressa em todos os tecidos,
 257 exceto o fígado. Por sua vez, a ATP7B é primordialmente expressa no fígado, sendo que
 258 ATP7B pode auxiliar na biossíntese de proteínas que incorporam o metal ou proteger a
 259 célula mediante compartimentalização para sua consequente excreção (La Fontaine e
 260 Mercer, 2007). Tem sido demonstrado que os níveis destas proteínas são afetados pela
 261 exposição ao Cu, devido ao seu papel fundamental na excreção do excesso de Cu
 262 citosólico a partir da célula, bem como a sua distribuição para as vias secretoras (Zhao
 263 et al., 2014).

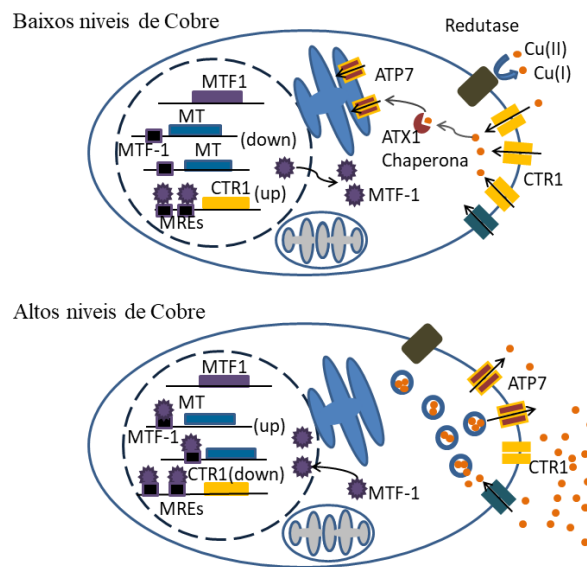


Figura 1. Esquema simplificado dos mecanismos regulados pelo MTF1 e o Cobre. Adaptado de Balamurugan and Schaffner, 2006. Schematic view of copper homeostasis in Drosophila.

264

265

266 1.4. Respostas gênicas dos organismos a ambientes contaminados

267

268 1.4.1. Contaminação, estresse e aclimação em peixes

269 As mudanças na expressão gênica resultantes da exposição a contaminantes são
 270 consideradas uma resposta sensível e mensurável que pode servir como sinal de alerta
 271 inicial no comprometimento da saúde do organismo em populações aclimatadas
 272 (Bozinovic e Oleksiak, 2011). Mudanças na expressão gênica também podem ser
 273 componentes importantes para a adaptação ambiental (Larsen et al., 2011). Portanto,
 274 ambientes estressantes promovem a adaptação darwiniana e a divergência (processo de
 275 diferenciação) que são fundamentais para a geração de biodiversidade. Por definição,
 276 um ambiente estressante é aquele no qual o processo de aclimação (plasticidade
 277 fenotípica) acontece, mas implica em um custo na aptidão do organismo (Storey e

278 Storey, 2000). Portanto, a plasticidade fenotípica pode ser definida como a habilidade
279 do genótipo de produzir diferentes fenótipos em resposta às condições ambientais
280 (Kelly et al., 2012).

281 Como o estresse afeta a taxa de adaptação, definida como a mudança na distribuição de
282 fenótipos por ano (Visser, 2008), pode se inferir então que conseqüentemente promove
283 a divergência. Sendo assim, existem duas hipóteses pelas quais o estresse pode afetar a
284 taxa de adaptação: (1) tanto a evolução quanto a adaptação em condições estressantes
285 pode acontecer mais rapidamente ao se apresentarem “alvos” específicos para seleção,
286 envolvendo respostas de aclimatação que podem precisar somente de mudanças
287 genéticas regulatórias e não as estruturais; (2) as condições estressantes podem atingir
288 múltiplas vias e as conseqüentes restrições genéticas podem levar a uma redução
289 importante na aptidão. Embora, possam ocorrer melhoras adaptativas sob condições
290 estressantes, as mutações seleccionadas podem comprometer a aptidão em outros
291 ambientes, implicando assim em “custos” energéticos em condições não estressantes.
292 (Storey e Storey, 2000).

293 Estudos de expressão são ferramentas importantes para a identificação de processos de
294 seleção local em peixes, diferenças nos níveis de expressão podem indicar adaptações
295 associadas à regulação de genes específicos. Sendo assim, são necessários mais estudos
296 comparativos focados em demonstrar (1) mudanças de expressão a estímulos ambientais
297 (plasticidade ambiental); (2) diferenças nos níveis de expressão basais das populações;
298 (3) variações entre populações expostas a ambientes em comum que permitam detectar
299 polimorfismos e (4) diferenças na expressão genética entre espécies que permitam
300 identificar evidências de adaptação na expressão (Larsen et al., 2011).

301 O estudo de mudanças na expressão entre diferentes agrupamentos da mesma
302 espécie, seguidos da exposição a condições ambientais idênticas, possibilita a
303 detecção de diferenças fenotípicas que são controladas em nível genético. Portanto,
304 experimentos de translocação recíproca permitem identificar tanto potenciais
305 componentes genéticos quanto componentes ambientais da adaptação e suas
306 possíveis interações. Assim, com a finalidade de identificar as sequências
307 regulatórias, se faz necessário ter uma ampla cobertura do genoma, e de
308 preferência, ter o genoma de múltiplos indivíduos completamente sequenciado
309 (Larsen et al., 2011). Um claro exemplo disso é o estudo desenvolvido com
310 populações do peixe *Fundulus heteroclitus*, no qual foi demonstrada a existência de
311 uma diferenciação genética entre agrupamentos adaptados localmente, permitindo
312 uma tolerância desta espécie de peixe frente a contaminação antropogênica. Isto foi
313 demonstrado pela identificação de padrões de expressão divergentes entre as
314 populações estudadas, devido aos efeitos fisiológicos da exposição prolongada a
315 contaminantes (Whitehead et al., 2011).

316

317 **1.4.2. Expressão gênica e evolução molecular**

318

319 Os principais objetivos dos estudos de genética evolutiva são: (I) elucidar os
320 mecanismos e bases genéticas que permitem a variação fenotípica entre espécies;
321 (II) identificar as mudanças genéticas e mecanismos moleculares que subjazem à
322 diversidade fenotípica e (III) compreender as pressões evolutivas sob as quais evolui
323 a diversidade fenotípica (Romero et al., 2012). É aceito que a evolução fenotípica
324 depende grandemente de mutações que alteram as sequências proteicas e/ou
325 mutações que afetam a regulação genética (Warnefors e Kaessmann, 2013).
326 Portanto, a análise de sequências de aminoácidos tem sido uma ferramenta útil para
327 compreender como o acúmulo de alterações que tem contribuído nos processos de
328 evolução molecular. A taxa de substituições de aminoácidos para uma dada proteína
329 que desenvolve uma função bem estabelecida, altera-se dependendo da natureza e
330 funcionalidade da proteína (Miyata e Yasunaga, 1980).

331

332 No nível de proteínas, existem muitos trabalhos de evolução molecular, porém
333 estudos comparativos a nível de sequências de aminoácidos devem ser feitos para

334 compreender em detalhe dita evolução. Portanto, o estudo das sequências de
335 nucleotídeos nas regiões codificantes do mRNA podem auxiliar a compreender
336 simultaneamente no mínimo dois níveis operacionais: o nível de proteína e de
337 mRNA. Sendo assim, a comparação direta entre sequências conhecidas de regiões
338 codificantes permite avaliar tanto as diferenças entre nucleotídeos em locais
339 específicos, geradas por substituições de nucleotídeos que levam a mudanças na
340 composição de aminoácidos, como aquelas que permitem mudanças sinônimas
341 (Miyata e Yasunaga, 1980). As mutações sinônimas na sequência do RNA não
342 geram mudanças na sequência da proteína, mas podem acarretar mudanças na
343 estrutura secundária do mRNA, afetando assim a estabilidade deste, a sua taxa de
344 transdução e sua precisão. Portanto, estas funções podem estar sob seleção (Liberles
345 et al., 2012). Se uma mutação que afeta o fenótipo se encontra na região codificante,
346 esta é considerada como sendo uma mutação regulatória (Hoekstra e Coyne, 2007).
347 Mesmo assim, a evolução das proteínas não depende só dos parâmetros biofísicos.
348 De fato, os parâmetros associados a processos de mutação e fixação também devem
349 ser considerados. Dentre eles incluem-se a taxa de mutação, a taxa de recombinação
350 e o tamanho efetivo da população. As interações destes parâmetros são complexas e
351 estão associadas a processos de seleção (Liberles et al., 2012). Não entanto, nem
352 todos os atributos da evolução das sequências de proteínas podem ser explicados a
353 partir da estrutura da proteína. A expressão genética tem sido descrita como uma
354 restrição importante na taxa de evolução das proteínas (Liberles et al., 2012).

355

356 **1.5. RNAseq em peixes**

357

358 As novas tecnologias de sequenciamento têm contribuído para gerar grandes
359 avanços, em nível de mapeamento e da anotação de transcriptomas de peixes, e
360 também para compreender muitos processos biológicos, tanto em espécies modelo
361 como em espécies não modelo. Dentre estes processos, destacam-se a adaptação
362 evolutiva, o desenvolvimento, as respostas imunológicas e as repostas a diversos
363 tipos de estresse (Qian et al., 2014). Os dados obtidos do sequenciamento de
364 transcriptoma total, além das sequencias individuais, fornece informação sobre a
365 localização das sequências a partir do ensemble do transcriptoma, o perfil de
366 expressão, os polimorfismos proteicos, as mutações e os locais de *splicing*. No caso

367 de populações selvagens de espécies não modelo, uma vantagem do RNAseq é que
368 não se necessita de um transcriptoma de referência nem de grandes quantidades de
369 indivíduos para se obter dados representativos da população (Bozinovic e Oleksiak,
370 2011). Além de contribuir para melhorar as inferências evolutivas a nível
371 comparativo (Luikart et al., 2003). Portanto, a análise do transcriptoma é uma
372 poderosa ferramenta para compreender as relações entre genótipo e fenótipo, além da
373 compreensão das vias subjacentes aos mecanismos de controle (Qian et al., 2014).

374 Em peixes, o uso do RNAseq tem permitido identificar novas regiões transcritas no
375 genoma (Qian et al., 2014). O *de novo assembly* (ensamble do transcriptoma total a
376 partir de pequenas sequencias), tem sido utilizado em muitas espécies, devido ao
377 baixo número de espécies com o genoma completamente sequenciado (Qian et al.,
378 2014). Estudos como aquele desenvolvido por Kavembe et al. (2015), demonstram a
379 importância do *de novo assembly* para espécies não modelo, já que se reduz a perda
380 de informações próprias da espécie. Adicionalmente, o RNAseq, permite identificar
381 tanto as mutações nas regiões codificantes do gene como visualizar as alterações nos
382 níveis de expressão deste (Miller et al., 2013). Devido a sua natureza quantitativa, o
383 RNAseq permite identificar mudanças na dinâmica do transcriptoma entre amostras e
384 em resposta a condições ambientais em nível de expressão, o que promove grandes
385 avanços no conhecimento dos processos de biologia do desenvolvimento,
386 imunologia, biologia evolutiva, fisiologia, toxicologia e doenças (Qian et al., 2014).
387 Portanto, o uso de genes expressos para estudos genômicos traz diversas vantagens:
388 reduz a complexidade e facilita as análises de populações, permite uma grande
389 precisão em processos de anotação funcional, permite que a informação seja
390 facilmente verificável e permite a diferenciação de padrões biológicos dos artefatos
391 devidos à técnica. Além disto, atualmente é aceito que as diferenças na expressão
392 genética podem ter um papel importante na adaptação de populações e na
393 diferenciação de espécies (De Wit et al., 2015), as quais podem favorecer a
394 sobrevivência das espécies frente a futuras mudanças ambientais (Luikart et al.,
395 2003).

396

397

398
399

1.5.1. Aplicações do RNAseq em toxicologia aquática de peixes

400 O principal objetivo da toxicologia aquática é elucidar os efeitos de substâncias tóxicas
401 nos organismos aquáticos em diferentes níveis (Pierron et al., 2011), desde o nível
402 molecular até os níveis de comunidade e ecossistema, visando criar alternativas de
403 monitoramento e controle dos níveis de contaminantes que são prejudiciais. Visto que
404 manifestações como mudanças em nível da expressão gênica podem ocorrer em
405 resposta ao estresse, o RNAseq permite a identificação de genes diferencialmente
406 expressos e as vias metabólicas que estão sendo afetadas sob as condições estressantes,
407 como a exposição subletal a contaminantes (Qian et al., 2014). Portanto, grandes
408 avanços podem ser feitos a partir do uso do RNAseq na área da ecotoxicologia, devido a
409 possibilidade do uso de espécies não modelo, com grande interesse ecológico em
410 estudos ambientais (Pierron et al., 2011).

411 Enquanto as exposições agudas têm como objetivo verificar respostas adaptativas dos
412 mecanismos de proteção, as exposições em longo prazo (crônicas) evidenciam o
413 comportamento de genes implicados na regulação e as vias específicas reguladas em
414 decorrência da exposição (Pierron et al., 2011). Existem alguns estudos com a
415 abordagem do transcriptoma que avaliam os efeitos de metais em peixes, mas que
416 abordam apenas os efeitos agudos em espécies aclimatadas (Santos et al., 2010) ou
417 avaliam as respostas apenas em nível sistêmico (Uren et al., 2013). Por sua vez, o
418 presente estudo aborda estas duas perspectivas.

419

420 1.6. *Hyphessobrycon luetkenii* e as Minas do Camaquã

421

422 **1.6.1. *Hyphessobrycon luetkenii*:** o lambari *Hyphessobrycon luetkenii* (Boulenger,
423 1887) é uma espécie dulciaquícola, onívora, de pequeno porte e rápido metabolismo o
424 que faz dele um organismo ideal para estudos toxicológicos. Sua distribuição geográfica
425 engloba as bacias de drenagens do Rio Grande do Sul e Uruguai, os rios costeiros do
426 Rio de Janeiro e a bacia do rio Paraguai. Assim, esta espécie também habita o sistema
427 da laguna dos Patos e as bacias dos rios Uruguai, Negro, Paraguai, Tramandaí,
428 Mampituba (Weiss, 2013) e Guaíba (Konrad e Paloski, 2000).

429 Os organismos desta espécie apresentam a linha lateral completa ou interrompida,
430 caráter usualmente empregado na distinção entre os gêneros *Astyanax* e
431 *Hyphessobrycon*. A espécie é diagnosticada pela presença de linha lateral incompleta ou
432 interrompida com 9-18 escamas perfuradas, dentes na série interna do pré-maxilar com
433 seis a sete cúspides, nadadeira anal com iii-v, 20-24 raios e pela presença de uma
434 mancha umeral verticalmente alongada e relativamente arredondada com uma extensão
435 estreita ventralmente, conferindo um formato geral de vírgula (Figura 2) (Carvalho et
436 al., 2012).

437 Devido a grande dificuldade de classificação do gênero *Astyanax* e a ampla distribuição
438 de caracteres em comum para o grupo dos Characidae, tem sido proposto que as
439 espécies dos gêneros *Astyanax* (*A. mexicanus*), *Markiana* Eigenmann e *Psellogrammus*
440 Eigenmann, bem como algumas espécies do gênero *Hyphessobrycon*, dentre elas
441 *Hyphessobrycon luetkenii*, como sendo sub grupos monofiléticos dos *Astyanax* (Weiss,
442 2013).



443

444 **Figura 2.** *Hyphessobrycon luetkenii*, foto de (Carvalho et al., 2012)

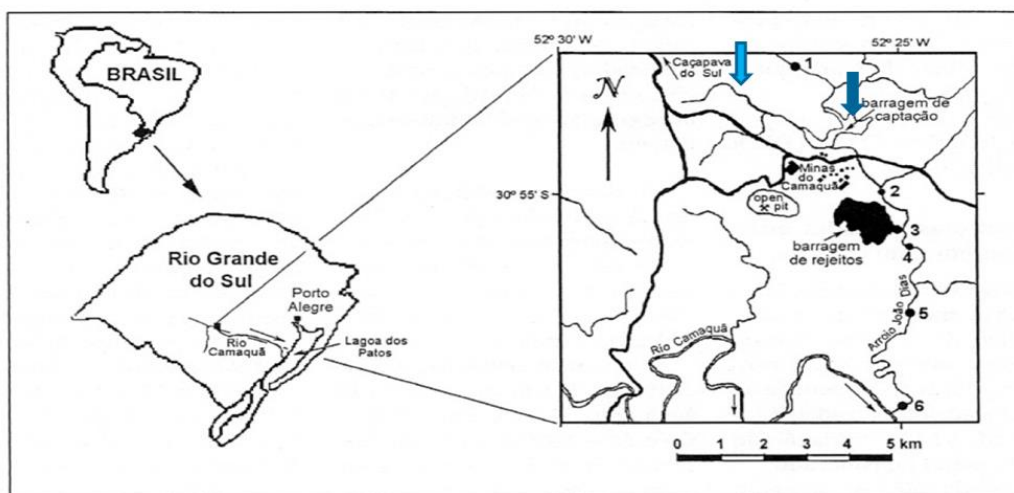
445

446 **1.6.1. Minas do Camaquã como um cenário natural para o estudo da** 447 **adaptação evolutiva**

448 A atividade de mineração do Cu nas Minas do Camaquã (Caçapava do Sul, RS) teve
449 início em 1870 e foi interrompida em 1996 (Ronchi e Lobato, 2000). Durante este
450 período, grandes quantidades de Cu, Fe, Mn e outros metais foram liberados no arroio
451 João Dias, sendo que os níveis totais e dissolvidos destes metais, especialmente o Cu,
452 foram registrados na área ainda neste século (Figura 3) (Bidone et al., 2001). Em um

453 estudo ecológico deste arroio foram reportadas 36 espécies de peixes, incluindo o
454 lambari *H. luetkenii*, que pertence à família Characidae (Konrad e Paloski, 2000). Em
455 virtude do acima exposto, é esperado que as comunidades de peixes que habitam os
456 recursos hídricos da região tenham sido expostas por muitas gerações a concentrações
457 elevadas e variáveis de metais. Portanto, a área de influência das Minas do Camaquã
458 proporciona um excelente cenário natural para o estudo e a compreensão dos efeitos da
459 exposição crônica de peixes a altas concentrações de metais na natureza. Assim, o
460 presente estudo pretende verificar se o estresse crônico imposto pela exposição crônica
461 a mistura de metais pode ter acarretado mudanças adaptativas no nível de expressão do
462 mRNA nas diversas agrupações de *H. luetkenii* que habitam o arroio João Dias nas
463 imediações na antiga área de mineração.

464



465

466 **Figura 3. Mapa das minas do Camaquã.** Localização e a ubicação aproximada dos
467 pontos de coleta do presente trabalho (C indicado em azul claro, P indicado em azul
468 escuro). Adaptado de (Laybauer, 1998)

469 2. Objetivos

470

471 **2.1. Objetivo Geral:** Caracterizar as alterações em nível de expressão de mRNA ou
472 no lambari *Hyphessobrycon luetkenii* do arroio João Dias em função da exposição
473 em curto e longo prazo a mistura de metais oriundos da mineração de Cu nas Minas
474 do Camaquã.

475

476 **2.2. Objetivos Específicos**

477

478 **2.2.1.** Verificar diferenças na tolerância ao Cu em peixes coletados em locais
479 contaminados e não contaminados por mistura de metais no arroio João Dias,
480 mediante experimentos de translocação.

481 **2.2.2.** Sequenciar os genes que codificam o Fator de Transcrição Responsivo a Metais-
482 1 (MTF1), as metalotioneínas (MT) e os transportadores de cobre (ATP7A e
483 CTR1) em *H.luetkenii*.

484 **2.2.3.** Avaliar e comparar o nível basal de expressão dos genes selecionados em peixes
485 coletados em locais contaminados e não contaminados do arroio João Dias.

486 **2.2.4.** Avaliar e comparar a expressão dos genes selecionados, após a translocação de
487 indivíduos de *H.luetkenii* para locais contaminados e não contaminados do
488 arroio João Dias.

489 **2.2.5.** Verificar possíveis diferenças em nível transcriptômico entre agrupações de *H.*
490 *luetkenii* de locais contaminados e não contaminados do arroio João Dias.

491

492 **Capítulo 1** (Manuscrito submetido no Journal of Comparative Biochemistry and
493 Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology)

494

495 **Metal accumulation and gene expression in the freshwater fish *Hyphessobrycon***
496 ***luetkenii* long-term adapted to metal enriched environment**

497

498 Sandra Isabel Moreno Abril¹, Patrícia Gomes Costa², Adalto Bianchini^{2*}

499

500 ¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências
501 Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Avenida Itália km 8, Campus
502 Carreiros, 96.203-900, Rio Grande, RS, Brazil

503 ² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG,
504 Avenida Itália km 8, Campus Carreiros, 96.203-900, Rio Grande, RS, Brazil

505

506

507 * Corresponding author: Dr. Adalto Bianchini
508 Universidade Federal do Rio Grande - FURG
509 Instituto de Ciências Biológicas
510 Av. Itália km 8, Campus Carreiros
511 96.203-900, Rio Grande, RS, Brazil.
512 Phone: +55 53 3293-5193
513 E-mail: adaltobianchini@furg.br

514

515 **Abstract**

516 Studies on the accumulation and effect of metal mixtures in fish are highlighted.
517 However, studies on how wild fish would respond to reduced concentrations of
518 waterborne metals after being chronically exposed to environments enriched with metal
519 mixtures are lacking. In the present study, metal (As, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn)
520 accumulation and expression of genes involved in metal metabolism (metallothioneins,
521 ATP7A and CTR1) were evaluated in the fish *Hyphessobrycon luetkenii* living in the
522 João Dias creek, a site historically (1870-1996) contaminated with metal mixtures
523 associated with copper mining (Minas do Camaquã, southern Brazil). Fish were
524 collected in a metal contaminated site of this creek and kept caged in this site (PP fish)
525 or translocated and kept caged in a non-contaminated site of this creek for 72 h (PC
526 fish). Results showed that gill metal concentrations and metallothionein gene expression
527 were lower in PC fish than in PP fish at any experimental time (24, 48 and 72 h). In
528 muscle, no significant changes were observed. These findings indicate that metal
529 accumulated in gills of wild fish chronically exposed to metal mixtures are more easily
530 excreted than those accumulated in the muscle. In this case, expression of gene
531 encoding for metallothionein plays a key role in the short-term regulation of metal
532 accumulation in gills of *H. luetkenii* living in an area historically contaminated with
533 metal mixtures associated with copper mining.

534

535 **Key words:** detoxification, gene expression, metal regulation, metal scavenger,
536 transporters

537 **1. Introduction**

538

539 Metal contamination in freshwater animals is widely evaluated (Farrell et al.,
540 2011; Wood et al., 2011). However, studies on species inhabiting environments
541 historically contaminated with metals can provide key evidences on how the phenotypic
542 plasticity can help fish to handle with these stressing environments in order to achieve
543 an ecological success (Whitehead et al., 2011). Accordingly, divergences among protein
544 sequences and genetic expression patterns are essential mechanisms for this success
545 (Romero et al., 2012) and diversity (Warnefors and Kaessmann, 2013).

546 Mechanisms involved in the regulation of cellular levels of metals include
547 several pathways for metal uptake, distribution, utilization, storage, detoxification, and
548 excretion (La Fontaine and Mercer, 2007). Due to the key biological role played by
549 essential metals such as Cu, Fe and Zn, specific transporting proteins are implicated in
550 the regulation of cellular metal uptake and internalization. In this context, the high-
551 affinity copper transporter of plasma membrane (CTR1) is the main transporting protein
552 responsible for Cu uptake (Zhao et al., 2014). Considering the oxidative damage
553 associated with the redox potential of some transition metals, such as Cu, Fe and Zn,
554 protective mechanisms have emerged in order to scavenge and/or inactivate these
555 metals. In this context, metallothioneins (MT) are the most representative example.
556 These proteins have low molecular weight and are rich in cysteine, thus showing ability
557 to bind metals. Indeed, their abundance is directly regulated by the external availability
558 of metals (Nunes et al., 2014). The expression of the gene encoding for MT is mainly
559 regulated by transcription factors responsive to metals, which bind at the promoter
560 region and stimulates MT expression (Balamurugan and Schaffner, 2006). Although
561 MT can bind the excessive amount of metals, they are not able to stock or eliminate it

562 from the cell. ATP7-type transporters are mainly involved in the intracellular
563 distribution of Cu (Balamurugan and Schaffner, 2006) and its subsequent excretion
564 (Zhao et al., 2014). This transporter has the ability of translocating Cu across cellular
565 membranes (La Fontaine and Mercer, 2007). Like CTR1 and MT, ATP7 levels can be
566 also modulated by Cu exposure (Zhao et al., 2014).

567 The analysis of metal accumulation and gene expression after exposure of fish to
568 a single metal is already widely explored (Farrell et al., 2011; Wood et al., 2011).
569 However, studies on the accumulation and effects of metal mixtures in fish are actually
570 highlighted. In fact, the evaluation of the possible interactions among metals is of
571 extreme importance for a better understanding of the effects of dissolved metals in wild
572 fish (Craig et al., 2009). Also, it is important to note that classical research on the
573 physiological effects of metal contamination is focused on laboratory studies with fish
574 acclimated to controlled conditions (Farrell et al., 2011; Wood et al., 2011). In this
575 context, studies performed with fish inhabiting areas chronically contaminated with
576 metal mixtures in the field, such as those associated with metal mining activities, are
577 much more realistic than to those performed under controlled laboratory conditions. In
578 this case, the scenario evaluated is much more realistic, with data generated being of
579 great ecological relevance. Finally, it is worth noting that studies evaluating on how fish
580 chronically exposed to metal mixtures in the wild would respond to reduced
581 concentrations of waterborne metals are lacking.

582 In the present study, we have evaluated the temporal dynamics of expression of
583 genes encoding for the main proteins involved in Cu uptake (CRT1), detoxification
584 (MT) and distribution and/or excretion (ATP7A) through a 72-h field translocation
585 experiment with a wild fish species inhabiting the João Dias creek (Minas do Camaquã,
586 southern Brazil), a site historically (1870-1996) contaminated with metal mixtures

587 associated with Cu mining (Ronchi and Lobato, 2000). Additionally, changes in gene
588 expression were paralleled by metal accumulation in fish gills and muscle. We
589 hypothesized that fish collected in the João Dias creek at the old mining area
590 contaminated with metal mixtures and translocated to a non-contaminated area upstream
591 of the same creek will show adaptive changes in the expression of genes involved in
592 metal metabolism, especially MT. Also, we expect that gene expression response will
593 be reflected by a significant excretion of the excessive amount of metals accumulated in
594 fish tissues, especially in the gills.

595

596 **2. Materials and methods**

597

598 *2.1 Fish translocation experiment*

599 The present experiment was performed in two sites of the João Dias creek
600 (Minas do Camaquã, southern Brazil): (1) a historically contaminated site within the old
601 Cu mining area (P site), and (2) a non-contaminated site 7 km upstream the old Cu
602 mining area (C site). Environmental parameters (temperature, pH, and dissolved oxygen
603 content) were monitored once a day during fish collection and the translocation
604 experiment. Male and female fish (*Hyphessobrycon luetkenii*; mean total body length =
605 4.32 cm; $n = 90$) were caught using a fish trap in the P site and kept caged at this site
606 (PP fish) or translocated and kept caged at the C site (PC fish) for 72 h. Cages (volume
607 = 5000 cm³) were built with PVC pipe structure and mesh. Fish were stocked at a
608 density <0.1 g fish/L. After 24, 48 and 72 h of experiment, fish were anesthetized with
609 benzocaine, decapitated and have their gills and muscle dissected. Tissue samples were
610 immediately placed in RNA-later (Ambion), following the manufacturer instructions.

611

612 2.2 Metal concentration analysis

613 All reagents used in the present study were of high-purity grade. Water used for
614 preparing all reagents and reference solutions was deionized and further purified using a
615 Milli-Q system (Millipore Corp., Bedford, USA). Tissue samples were completely
616 digested using 65% HNO₃ (Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany). Metal (As, Cd, Cu,
617 Fe, Mn, Pb and Zn) concentrations were determined by High-Resolution Continuum
618 Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, model Control-A 700 (HR-
619 CS GF AAS, Analytic Jena, Germany), equipped with AGS-GF and a transversely
620 heated graphite tube atomizer. Pyrolytic graphite tubes with platforms were used. A Xe
621 short-arc lamp (GLE, Berlin, Germany) in “hot-spot” mode was used as radiation
622 source.

623 The quality assurance and quality control procedures for metal quantification
624 were based on regular analyses of blanks and spiked matrices. Measurement accuracy
625 and standard curves were obtained using standard solutions prepared by serial dilution
626 of 1000 mg/L stock solutions (Multi-Element Standards Certipur[®], Merck, Darmstadt,
627 Germany). Certified reference material (Fish protein DORM-3, National Research
628 Council Canada, Ottawa, ON, Canada) was also analyzed to confirm extraction
629 efficiency. Percentage of metal recovery based on standard reference material, prepared
630 as described for tissue samples, showed good agreement with the certified values. In
631 fact, metal recoveries ranged from 91.1 and 106.4%. All procedures and analyses were
632 performed in triplicate.

633

634 2.3 Relative gene expression

635 Based on the conserved regions of the elongation factor 1 alpha (EF1 α), MT,
636 ATP7A and CTR1 gene sequences reported for the freshwater fish *Astyanax mexicanus*

637 and other characiformes, primers were designed for *quantitative polymerase chain*
638 *reaction (qPCR)*. Designed primers were used to determine the partial sequence, as well
639 as the relative expression of target genes in gills and muscle of *H.luetkenii* kept at the
640 metal contaminated site or translocated to the non-contaminated site. The following
641 primers were used: MT (Met_F ATGGATCCCTGTGACTGCG; Met_R
642 TTTCTTGCAGGATGTGCACTG); ATP7A (ATP7A_F
643 ATGGGTCTGGAAGTGGTGC and ATP7A_R GCAAACACCTTCCTGATGCC);
644 CTR1 (CTR1_F ATGTGGAGCTGCTCTTTGCT; CTR1_R
645 CGATCTTCAGCCCCTCGTAG); and EF1 α (EF1_F ATCATCCTGAACCACCCTG;
646 EF1_R ATGGCAGCATCTCCAGAC), as housekeeping gene.

647 Total mRNA was extracted with QIAzol (Qiagen), reversely transcribed using
648 the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) and RNase
649 inhibitor (Applied Biosystems). The relative expression was quantified using real-time
650 PCR, using the GoTaq Kit (Promega) and ABI PRISM $\text{\textcircled{R}}$ 7300 machine (Applied
651 Biosystems). Data were analyzed using the $2^{-\Delta\text{CT}}$ method (Schmittgen and Livak, 2008).

652

653 *2.4 Data presentation and statistical analysis*

654 Data on relative gene expression and metal accumulation in gills and muscle of
655 *H.luetkenii* were expressed as mean \pm standard error (n = 5). Mean values were
656 compared using Factorial (experimental time and fish group) Analysis of Variance
657 (ANOVA) followed by the Tukey test. ANOVA assumptions were previously verified
658 using the normal probability plot for raw residuals (data normality) and the Cochran C
659 test (homogeneity of variances). In all cases, the significance level adopted was 95% (α
660 = 0.05).

661

662 2.5 Ethics and legal statements

663 All procedures associated with the present study were approved by the
664 University Committee for Ethics in Animal Use (CEUA; protocol #
665 23116.001365/2015-44) and the Brazilian Ministry of the Environment (MMA;
666 research license # 44769-1).

667

668 **3. Results and Discussion**

669

670 Concentrations of all metals analyzed were significantly lower in gills of fish
671 translocated from the metal contaminated site to the non-contaminated site in the João
672 Dias creek than in gills of those kept caged at the contaminated site. Decreases in gill
673 metal concentrations were seen after a short period of time, only 24 h after translocation
674 of fish from the contaminated site to the non contaminated site. These decreases were
675 maintained up to 72 h of experiment (Table 2). Data on environmental parameters
676 showed no significant differences in water pH (contaminated site: 5.02 ± 0.02 ; non-
677 contaminated site: 5.08 ± 0.06) and dissolved oxygen content (contaminated site: $6.95 \pm$
678 0.11 ; non-contaminated site: 7.07 ± 0.10 mg O₂/L) at the two sites of the João Dias
679 creek. Only a slightly difference in water temperature was observed between the two
680 sites (contaminated site: 26.8 ± 0.37 °C; non-contaminated site: 24.6 ± 0.39 °C). This
681 difference could be explained by the fact that the non-contaminated site is
682 approximately 7 km closer to the João Dias creek spring than the contaminated site. In
683 turn, changes observed in metal concentrations observed in gills of *H.luetkenii*
684 collected in the contaminated site and translocated to the non-contaminated site of the
685 João Dias creek can be ascribed to the lower levels of metals found in the non-
686 contaminated site. The mining activity in the Minas do Camaquã district (Caçapava do

687 Sul city, Rio Grande do Sul state, southern Brazil) started in ~1870 and ended in 1996
688 (Ronchi and Lobato, 2000). Mining operations released great amounts of Cu, Fe, Mn,
689 and other metals in the João Dias creek for more than a century (Bidone et al., 2001).
690 Despite the mining activities have stopped approximately two decades ago, metal
691 contamination can still be detected in the old mining area. Studies developed over the
692 last 20 years have reported variable levels of several metals, especially Cu, in waters of
693 the João Dias creek. Total concentrations are dependent on the distance from the old
694 mining area. They were in the range of 1.4-2.2, 0.3-0.6, 9-179, 1150-2040, 60-160, 6.8-
695 7.7 and 16-128 µg/L for As, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn, respectively (Bidone et al.,
696 2001; Aldrovandi, 2012).

697 Based on the designed primers, partial sequences of genes encoding for MT,
698 ATP7A and CTR1 in the freshwater fish *H. luetkenii* were identified. Their coverage
699 was verified by comparison with the amino acid sequences of the freshwater fish *A.*
700 *mexicanus* and the correspondent conserved domains of equivalent proteins (Table 1).
701 This procedure was performed based on the NCBI conserved domain tool
702 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

703 A fragment consisting of 170 pb was identified for the EF1a gene in *H. luetkenii*.
704 It corresponds to the domain III of the elongation factor (EF) and related proteins. This
705 sequence has 98% identity and 100% coverage with the same region of the elongation
706 factor 1 alpha mRNA of *A. mexicanus* (**JF273743.1**). The expression of the EF1a gene
707 was employed to normalize the expression of all other genes analyzed (Table 1). A
708 sequence of 91 pb was identified for the MT gene in *H. luetkenii*. It has 97% identity
709 and 97% coverage with the predicted sequence for the metallothionein-1-like mRNA of
710 *A. mexicanus* (**XM 007249200.2**). It corresponds to the sequence of the metallothionein
711 superfamily pfam00131 (Table 1). A fragment of 108 pb was identified for the CTR1

712 gene in *H. luetkenii*. It corresponds to the predicted sequence for the solute carrier
713 family 31 [Cu transporter, member 1 (slc31a1)] mRNA of *A. mexicanus*. It encodes for
714 the CTR1 protein, showing 99% identity and 99% coverage with the same region of the
715 CTR1 gene in *A. mexicanus* ([XM_007231415.2](#)). The translated sequence has 100%
716 identity with the predicted sequence for the high affinity Cu uptake protein 1 of *A.*
717 *mexicanus* ([XP_007231477.1](#)) (Table 1). Finally, it was identified a sequence with 82
718 pb corresponding to the ATP7A gene in *H. luetkenii*. It has 100% identity and 100%
719 coverage with the same region of the predicted sequence for the ATPase Cu
720 transporting alpha (ATP7A) mRNA of *A. mexicanus* ([XM_007253627.2](#)) (Table 1). The
721 conserved domain analysis confirmed that this sequence corresponds to the haloacid
722 dehalogenase (HAD) superfamily, which includes carbon and phosphorus hydrolases
723 such as 2-haloalkanoate dehalogenase, epoxide hydrolase, phosphoserine phosphatase,
724 phosphomannomutase, phosphoglycolate phosphatase, P-type ATPase, among others.

725 It is worth noting that the reduced metal concentrations observed in gills of fish
726 collected at the contaminated area and translocated to the non contaminated area were
727 paralleled by a significant lower expression of gene encoding for MT, without any
728 significant change in the expression of CTR1 and ATP7A genes (Fig. 1). This finding is
729 in complete agreement with the fact a higher level of MT was observed in gills of the
730 trout *Salmo trutta* (Uren et al., 2013). These are clear evidence of the involvement of the
731 regulation of MT gene expression in the mechanism associated with metal tolerance in
732 fish populations inhabiting environments chronically contaminated with metals. It is
733 important to note that fish displayed a fast response to site translocation, showing
734 reduced concentrations of metals and MT gene expression in gills after only 24 h of
735 experiment. Indeed, the uptake and accumulation of Cu and other metals by fish gills
736 are shown to be fast processes (Grosell and Wood, 2002; Farrell et al., 2011; Wood et

737 al., 2011; Eyckmans et al., 2012). Therefore, our findings highlight the importance of
738 evaluating both tissue metal concentration and gene expression in a time frame that
739 allows tracking these fast responses, especially in fish populations long-term adapted to
740 environments historically contaminated with metal mixtures. Additionally, they indicate
741 that populations of *H. luetkenii* have the ability keep relatively stable levels of Cu and
742 other metals in their gills following subtle changes in the concentrations of waterborne
743 metals. Also, our findings support the idea that mechanisms involved in detoxification
744 and metal excretion is an efficient strategy for the ecological success of the freshwater
745 fish *H. luetkenii* to inhabit areas historically contaminated with metal mixtures.
746 At this point, it is important to emphasize the key role of fish gills in rapidly controlling
747 the excess of Cu and other metals (Grosell and Wood, 2002).

748 Finally, it is worth mentioning that reductions in metal concentrations and MT
749 gene expression in gills of fish translocated from the contaminated site to the non
750 contaminated site was paralleled by a lack of change in metal concentrations (Table 3)
751 and gene (MT, ATP7A and CTR1) expression in fish muscle over the whole
752 experimental time (Fig. 2). This would be evidence that the regulatory process for
753 uptake or excretion of metals in fish is not centered in the muscle. Indeed, it was
754 recently reported for some freshwater fish that muscle is only a minor site for
755 accumulation of Cu and other metals when compared to gills and liver (Jia et al., 2017).

756 The importance of accessing the effects of metal mixtures, as evaluated in the
757 present study, has been actually highlighted. In fact, the evaluation of the possible
758 interactions among metals is important for a better understanding of the effects of
759 dissolved metals in aquatic systems (Craig et al., 2009). In this context, studies
760 performed with fish inhabiting areas chronically contaminated with metal mixtures,
761 such as those from the João Dias creek (Minas do Camaquã, Caçapava do Sul city, Rio

762 Grande do Sul state, southern Brazil), is a much more realistic approach when compared
763 to studies performed under controlled laboratory conditions. In fact, the Minas do
764 Camaquã district is a natural scenario that brought us the opportunity to study how
765 long-term metal mining can affect fish populations.

766

767 **Acknowledgements**

768

769 Thanks to the Institute of Biological Sciences of the Federal University of Rio
770 Grande for all the laboratory support and MSc. Vinícius Dias Borges for his help in the
771 field experiment. The present study was financially supported by grants from the
772 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Instituto
773 Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática, Brasília, DF, Brazil. grant #
774 573949/2008-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
775 (CAPES, Brasília, DF, Brazil, grant # 230/2010), and International Development
776 Research Centre (IDRC, Ottawa, ON, Canada, grant # 104519-027).

777

778 **References**

779 Aldrovandi, P., 2012. Avaliação da contaminação por metais na área das Minas do
780 Camaquã. <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/64071>
781 Balamurugan, K., Schaffner, W., 2006. Copper homeostasis in eukaryotes: Teetering on
782 a tightrope. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 737-746.
783 Bidone, E.D., Laybauer, L., Castilhos, Z.C., Maddock, J.L., 2001. Environmental risk
784 increase due to heavy metal contamination caused by a copper mining activity in
785 Southern Brazil. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 73, 277-286.

786 Craig, P.M., Galus, M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2009. Dietary iron alters
787 waterborne copper-induced gene expression in soft water acclimated zebrafish
788 (*Danio rerio*). Am. J. Physiol. [Regul. Integr. Comp. Physiol.](#) 296, R362-R373.

789 Eyckmans, M., Benoot, D., Van Raemdonck, G.A.A., Zegels, G., Van Ostade, X.W.M.,
790 Witters, E., Blust, R., De Boeck, G., 2012. Comparative proteomics of copper
791 exposure and toxicity in rainbow trout, common carp and gibel carp. Comp.
792 Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics 7, 220-232.

793 Farrell, A.P., Brauner, C.J., Wood, C.M., 2011. Homeostasis and Toxicology of Non-
794 Essential Metals. Fish Physiology, Vol. 31B, Academic Press, 511 p.

795 Grosell, M., Wood, C.M., 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms
796 of apical entry. J. Exp. Biol. 205, 1179-1188.

797 Jia, Y., Wang, L., Qu, Z., Wang, C., Yang, Z., 2017. Effects on heavy metal
798 accumulation in freshwater fishes: species, tissues, and sizes. Environ. Sci.
799 Pollut. Res. 24, 9379-9386.

800 La Fontaine, S., Mercer, J.F.B., 2007. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and
801 ATP7B: Role in copper homeostasis. Arch. Biochem. Biophys. 463, 149-167.

802 Nunes, B., Brandão, F., Sérgio, T., Rodrigues, S., Gonçalves, F., Correia, A.T., 2014.
803 Effects of environmentally relevant concentrations of metallic compounds on the
804 flatfish *Scophthalmus maximus*: biomarkers of neurotoxicity, oxidative stress
805 and metabolism. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 7501-7511.

806 Romero, I.G., Ruvinsky, I., Gilad, Y., 2012. Comparative studies of gene expression
807 and the evolution of gene regulation. Nat. Rev. Genet. 13, 505-516.

808 Ronchi, L.H., Lobato, A.O.C., 2000. Avaliação do estado da qualidade das águas e da
809 contaminação dos sedimentos recentes do arroio João Dias após encerramento
810 das atividades das minas do Camaquã, RS. In: Ronchi, L.H., Lobato, A.O.C

811 (eds). Minas do Camaquã, um Estudo Multidisciplinar. UNISINOS, Canoas, RS,
812 Brazil.

813 Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative
814 CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101-1108.

815 Uren Webster, T.M., Bury, N., van Aerle, R., Santos, E.M., 2013. Global transcriptome
816 profiling reveals molecular mechanisms of metal tolerance in a chronically
817 exposed wild population of brown trout. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8869-8877.

818 Warnefors, M., Kaessmann, H., 2013. Evolution of the correlation between expression
819 divergence and protein divergence in mammals. *Genome Biol. Evol.* 5, 1324-
820 1335.

821 Whitehead, A., Galvez, F., Zhang, S., Williams, L.M., Oleksiak, M.F., 2011. Functional
822 genomics of physiological plasticity and local adaptation in killifish. *J. Hered.*
823 102, 499-511.

824 Wood C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J., 2011. Homeostasis and Toxicology of
825 Essential Metals. *Fish Physiology*, Vol. 31A, Academic Press, 520 p.

826

827 Zhao, L., Xia, Z., Wang, F., 2014. Zebrafish in the sea of mineral (iron, zinc, and
828 copper) metabolism. *Front. Pharmacol.* 5, 33.

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839 **Figure Captions**

840

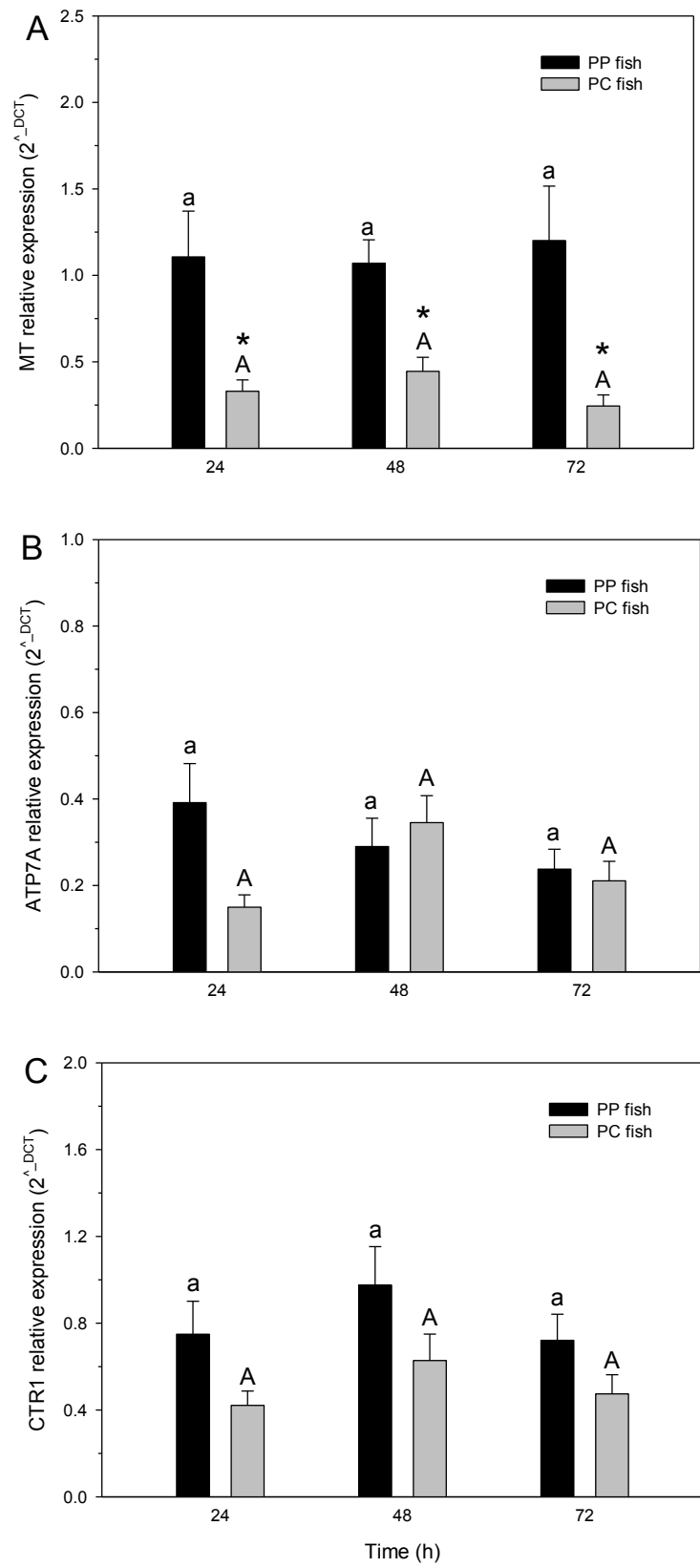
841 **Figure 1.** Relative gene expression (A: metallothionein; B:ATP7A; and C: CTR1) in
842 gills of the freshwater fish *Hyphessobrycon luetkenii* collected at the contaminated site
843 and kept caged in this site (PP fish) or collected at the contamination site, translocated
844 and kept caged in the non-contaminated site (PC fish) for 72 h. Data are expressed as
845 mean \pm standard error (n = 5). Different small and capital letters indicate significant
846 differences over the experimental time for PP and PC fish, respectively. The asterisk
847 indicates significant difference between the two experimental groups (PP and PC fish)
848 at each experimental time.

849

850 **Figure 2.** Relative gene expression (A: metallothionein; B:ATP7A; and C: CTR1) in
851 muscle of the freshwater fish *Hyphessobrycon luetkenii* collected at the contaminated
852 site and kept caged in this site (PP fish) or collected at the contamination site,
853 translocated and kept caged in the non-contaminated site (PC fish) for 72 h. Data are
854 expressed as mean \pm standard error (n = 5). Different small and capital letters indicate
855 significant differences over the experimental time for PP and PC fish, respectively. The
856 asterisk indicates significant difference between the two experimental groups (PP and
857 PC fish) at each experimental time.

858

859 **Figure 1**



860

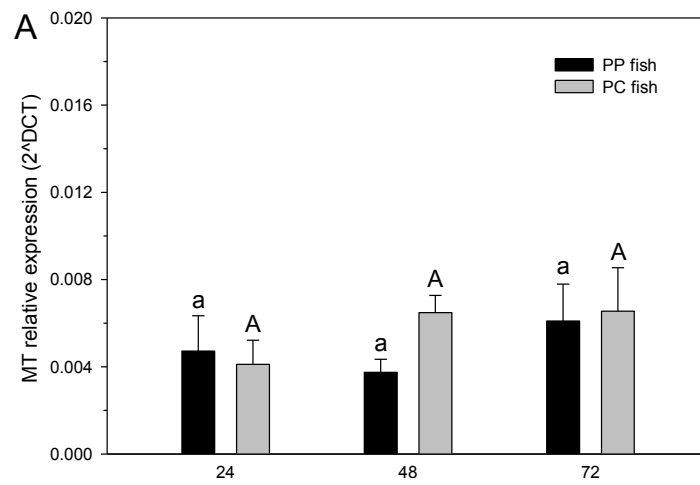
861

862

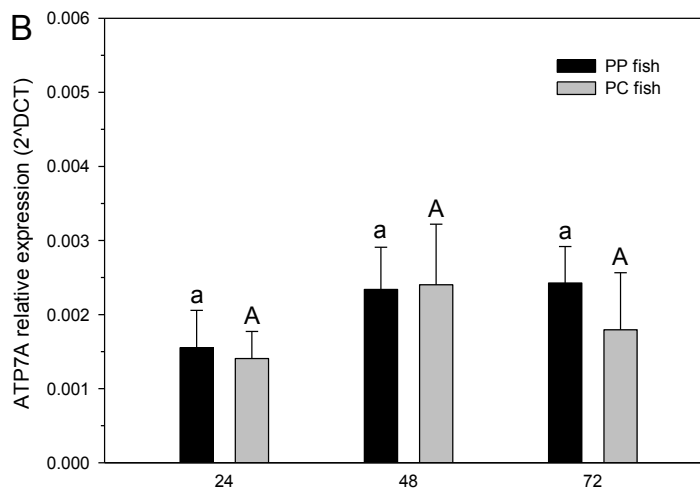
863

864

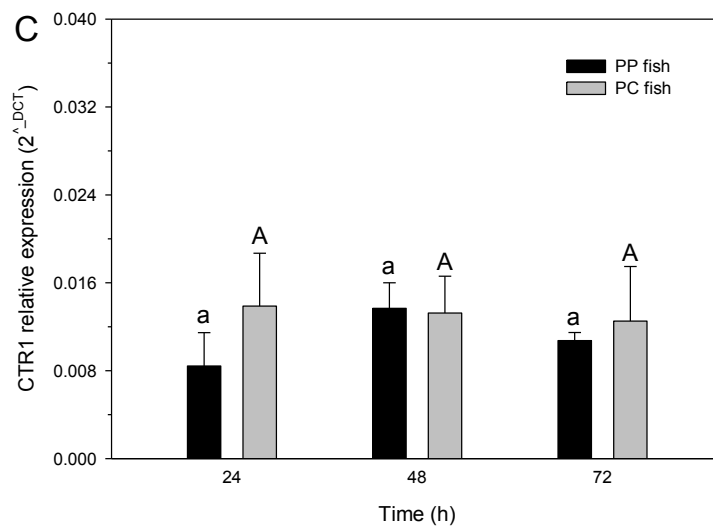
865 **Figure 2**



866



867



868

869

870 **Table 1.** Partial sequences of metallothionein (MT) and metal-transporting proteins
 871 (ATP7A and CTR1) in the freshwater fish *Hyphessobrycon luetkenii*. Identity (%) and
 872 coverage (%) were compared against the sequences reported for the fish *Astyanax*
 873 *mexicanus*.
 874

Sequence	pb	Identity	Coverage
EF_H. luetkenii EF_A. mexicanus 1 ATCATCTGAA ACCACCCGG TCAGACTTT AGGGCTAAG CTCCTGCGT GGTATGCCAC ATCATCTGAA ACCACCCGG TCAGACTTT AGGGCTAAG CTCCTGCGT GGTATGCCAC	170	98	100
EF_H. luetkenii EF_A. mexicanus 61 ACGGTCACAA TCGCTGCATA GTTCGTTCMG TTCAAGGAGT AGATTCGACCG TCGTTCGGGA ACGGTCACAA TCGCTGCATA GTTCGTTCMG TTCAAGGAGT AGATTCGACCG TCGTTCGGGA			
EF_H. luetkenii EF_A. mexicanus 121 AAGCAAGCTTG AGGACAAACC CAAGAACCCT AAGTCGGAG ATGCTGCCAT AAGCAAGCTTG AGGACAAACC CAAGAACCCT AAGTCGGAG ATGCTGCCAT			
MT_A. mexicanus MT_H. luetkenii 1 ATGGATCCCT GTGACTGGGC CAAGACTGGT AGCTGCATCT CTGCTACCAAG CTGCAAAAGC ATGGATCCCT GTGACTGGGC CAAGACTGGT AGCTGCATCT CTGCTACCAAG CTGCAAAAGC	91	97	97
MT_A. mexicanus MT_H. luetkenii 61 ACAAACTGCC AGTGTACATC CTGCAGAAA AG ACAAACTGCC AGTGTACATC CTGCAGAAA AA			
ATP7A_H. luetkenii ATP7A_A. mexicanus 1 GTCCTGGAACT GCTGCTGATG ACCGGGGAACA ACAGCAAAAC TGCACGAGCC GTCCTGGAACT GCTGCTGATG ACCGGGGAACA ACAGCAAAAC TGCACGAGCC	82	100	100
ATP7A_H. luetkenii ATP7A_A. mexicanus 51 ATCGGTGCAAC AGGTTGGCAT CAGGANGGTG TT ATCGGTGCAAC AGGTTGGCAT CAGGANGGTG TT			
CTR1_H. luetkenii CTR1_A. mexicanus 1 TGTGGAGTTG CTCTTTGCTG GACTTGTCA CAACTCACCG GGAGAGATGG TGTGGAGTTG CTCTTTGCTG GACTTGTCA CAACTCACCG GGAGAGATGG	121	97	90
CTR1_H. luetkenii CTR1_A. mexicanus 51 TAGGGCTCTG TATGGGGGG TTTTGTGTA GTCCTTCTA GAGGGGGTGG TAGGGCTCTG TATGGGGGG TTTTGTGTA GTCCTTCTA GAGGGGGTGG			
CTR1_H. luetkenii CTR1_A. mexicanus 101 AAGATCGACG TTCATCAGG G AAGATCGACG GGGATCTCT G			

875

876 **Table 2.** Metal concentration in gills of the freshwater fish *Hyphessobrycon luetkenii*
877 collected at the contaminated site and kept caged in this site (PP fish) or translocated
878 and kept caged in the non-contaminated site (PC fish) for 72 h. Data are expressed as
879 mean \pm standard error (n = 5). Different letters indicate significant differences over the
880 time for each fish group (P<0.05). The asterisk indicates significant difference between
881 PP and PC fish at each time (P<0.05).

882

Metal	Experimental time	PP fish ($\mu\text{g/g ww}$)	PC fish ($\mu\text{g/g ww}$)
As	24	0.0190 \pm 0.0082 ^a	0.0051 \pm 0.0012 ^{a*}
	48	0.0244 \pm 0.0056 ^a	0.0060 \pm 0.0007 ^{a*}
	72	0.0293 \pm 0.0066 ^a	0.0081 \pm 0.0010 ^{a*}
Cd	24	0.1695 \pm 0.0720 ^a	0.0490 \pm 0.0053 ^{a*}
	48	0.1931 \pm 0.0342 ^a	0.0495 \pm 0.0042 ^{a*}
	72	0.2162 \pm 0.0419 ^a	0.0626 \pm 0.0065 ^{a*}
Cu	24	0.6711 \pm 0.0060 ^a	0.3318 \pm 0.0236 ^{a*}
	48	0.5325 \pm 0.0413 ^a	0.3049 \pm 0.0295 ^{a*}
	72	0.6039 \pm 0.0421 ^a	0.3575 \pm 0.0314 ^{a*}
Fe	24	32.109 \pm 2.2840 ^a	21.881 \pm 4.2983 ^{a*}
	48	31.786 \pm 2.4938 ^a	17.029 \pm 2.8224 ^{a*}
	72	35.208 \pm 3.6094 ^a	10.544 \pm 0.8102 ^{a*}
Mn	24	28.529 \pm 1.4358 ^a	18.237 \pm 1.8740 ^{a*}
	48	23.789 \pm 0.8785 ^a	17.068 \pm 1.9231 ^{a*}
	72	25.871 \pm 4.0263 ^a	15.429 \pm 2.2538 ^{a*}
Pb	24	0.0881 \pm 0.0128 ^a	0.0308 \pm 0.0078 ^{a*}
	48	0.0769 \pm 0.0189 ^a	0.0288 \pm 0.0057 ^{a*}
	72	0.0757 \pm 0.0357 ^a	0.0416 \pm 0.0233 ^{a*}
Zn	24	32.408 \pm 2.6627 ^a	21.412 \pm 1.6376 ^{a*}
	48	32.038 \pm 3.2721 ^a	18.737 \pm 0.8895 ^{a*}
	72	33.630 \pm 2.9593 ^a	20.665 \pm 2.3845 ^{a*}

883

884 **Table 3.** Metal concentration in muscle of freshwater fish *Hyphessobrycon luetkenii*
885 collected at a metal contaminated site and kept caged in this site (PP fish) or
886 translocated and kept caged at a non-contaminated site (PC fish) for 72 h. Data are mean
887 \pm standard error (n = 5). Different letters indicate significant differences over the time
888 for each fish group (P<0.05). The asterisk indicates significant difference between PP
889 and PC fish at each time (P<0.05).

890

Metal	Experimental time	PP fish ($\mu\text{g/g ww}$)	PC fish ($\mu\text{g/g ww}$)
As	24	0.0014 \pm 0.0002 ^a	0.0015 \pm 0.0003 ^a
	48	0.0016 \pm 0.0004 ^a	0.0011 \pm 0.0002 ^a
	72	0.0016 \pm 0.0004 ^a	0.0015 \pm 0.0004 ^a
Cd	24	0.0127 \pm 0.0019 ^a	0.0113 \pm 0.0016 ^a
	48	0.0128 \pm 0.0024 ^a	0.0089 \pm 0.0009 ^a
	72	0.0128 \pm 0.0024 ^a	0.0115 \pm 0.0021 ^a
Cu	24	0.0910 \pm 0.0147 ^a	0.1685 \pm 0.0375 ^a
	48	0.0819 \pm 0.0169 ^a	0.1602 \pm 0.0384 ^a
	72	0.1884 \pm 0.0383 ^a	0.2008 \pm 0.0300 ^a
Fe	24	1.3812 \pm 1.3827 ^a	0.8930 \pm 0.2090 ^a
	48	1.1115 \pm 0.0596 ^a	1.2608 \pm 0.2397 ^a
	72	1.4587 \pm 0.3259 ^a	1.2576 \pm 0.0862 ^a
Mn	24	1.5001 \pm 0.3919 ^a	1.5137 \pm 0.2460 ^a
	48	1.1545 \pm 0.2260 ^a	1.8445 \pm 0.3177 ^a
	72	1.3877 \pm 0.2799 ^a	1.3301 \pm 0.1578 ^a
Pb	24	0.0363 \pm 0.0330 ^a	0.0078 \pm 0.0034 ^a
	48	0.0124 \pm 0.0098 ^a	0.0224 \pm 0.0095 ^a
	72	0.0054 \pm 0.0020 ^a	0.0185 \pm 0.0085 ^a
Zn	24	4.8954 \pm 0.1769 ^a	4.0619 \pm 0.6115 ^a
	48	4.6962 \pm 0.2669 ^a	4.6507 \pm 0.5623 ^a
	72	5.4367 \pm 0.8866 ^a	5.7904 \pm 0.3767 ^a

891

892

893

894 **Capítulo 2** (Manuscrito submetido no Journal of Environmental toxicology and
895 Pharmacology)

896

897 **Expression of genes related to metal metabolism in the freshwater fish *Hyphessobrycon***
898 ***luetkenii* living in a historically contaminated area associated with copper mining**

899

900 Sandra Isabel Moreno Abril¹, Camila Dalmolin², Patrícia Gomes Costa², Adalto

901 Bianchini^{2*}

902

903 ¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Rio
904 Grande - FURG, Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96.203-900, Rio Grande, RS,
905 Brazil.

906 ²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av.
907 Itália km 8, Campus Carreiros, 96.203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

908

909 * **Corresponding author:** Sandra Isabel Moreno Abril

910 Universidade Federal do Rio Grande - FURG

911 Instituto de Ciências Biológicas

912 Av. Itália km 8, Campus Carreiros

913 96.203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

914 e-mail: pluieag@gmail.com

915 Tel: +55 53 991798228

916

917 **Abstract**

918 Copper (Cu) mining in Minas do Camaquã-Brazil, released significant amounts
919 of metals into the João Dias creek, where *Hyphessobrycon luetkenii* inhabit. Because the
920 involvement of Cu in biological processes its concentration and availability is regulated
921 by molecules as the metal regulatory transcription factor (MTF-1) metallothionein (MT)
922 and transporters (ATP7A and CTR1). These genes were whole sequenced and their
923 expression (GE) evaluated in gills, liver and intestine. Were collected fish in non-
924 contaminated and contaminated (Cu 3.4-fold higher) sites of the creek (CC and PP) and
925 respectively translocated (CP and PC) for 96 h.

926

927 The GE of the non-translocated groups evidenced that MT, MTF-1 and CTR1 have
928 organ specific differences between both communities. Additionally the translocation
929 allowed to identify organ specific changes associated with the activation/inactivation of
930 protective mechanisms. These findings indicate that MTF-1, MT and CTR-1 GE play an
931 important role in the tolerance of *H. luetkenii* to Cu contamination.

932

933 **Keywords:** gene expression; metallothionein; transcription factor; transporter

934

935 **1. Introduction**

936

937 Metals such as Cu, Fe and Zn are all essential micronutrients. They are involved
938 in electron transference in biological processes like respiration and photosynthesis.
939 Also, they can be part of the structure of several proteins. However, they can be toxic to
940 organisms if present at excessive concentrations in the environment. Indeed,
941 anthropogenic activities can release great amounts and complex mixtures of metals into
942 the environment. Therefore, organisms must regulate the internal level of these metals
943 to avoid the potential injuries they can induce to cells and tissues.

944 The metal transcription factor (MTF) is a metalloregulatory protein (Andrews,
945 2001). MTF is a structurally highly conserved molecule from fish to mammals,
946 especially in the zinc finger DNA binding domains, which ensures a conserved
947 functionality to this molecule (Maur et al., 2005). MTF-1 is considered as the most
948 important transcription factor implicated in the metallothionein (MT) gene regulation in
949 response to metal (Zn, Cd, Cu, Ni and Pb) exposure (Heuchel et al., 1994). Actually, it
950 is accepted that MTF-1 is essential for both basal MT expression and metal-induced MT
951 expression (Otsuka, 2001).

952 The role of MTF-1 in metal homeostasis is well established. It can up regulate
953 the expression of exporters and scavengers and repress the expression of importers in
954 response to metal exposure (Günther et al., 2012). MTF-1 activates transcription in
955 response to metal load by binding to short DNA sequence motifs, the metal responsive
956 elements (MREs) found in metallothionein gene promoters (Maur et al., 2005). In turn,
957 MREs are binding sites for the transcription factor MTF-1 (Andrews, 2001). However,
958 the effects of MTF-1 are not limited to gene induction. In fact, it has been demonstrated
959 that several genes can be down-regulated by this transcription factor in the freshwater

960 fish *Danio rerio* (Hogstrand et al., 2008). Also, the relationship between metal
961 homeostasis and the regulatory mechanism of response to oxidative stress can alter the
962 expression of genes associated with this process (Giedroc et al., 2001). Additionally,
963 MTF-1 has been suggested as a Zn sensor that coordinates the expression of genes
964 involved in Zn homeostasis, as well as the protection against metal toxicity and
965 oxidative stress (Heuchel et al., 1994).

966 Despite the important role of MTF-1 in Zn homeostasis, it has been
967 demonstrated that this transcription factor is also implicated in Cu balance, handling
968 both intake and excretion of Cu. In flies, high Cu levels activate MT and ATP7 genes
969 (Günther et al., 2012), while MTF-1 activates the gene encoding for the Cu importer
970 Ctr1B at low levels of Cu (Selvaraj et al., 2005; Balamurugan and Schaffner, 2006) .
971 ATP7A and CTR1 are integral membrane proteins. CTR proteins are exclusive of
972 eukaryotes. They do not use ATP as energy source, but the intracellular concentration
973 gradient to carry preferentially Cu(I). ATPases are ubiquitous, being present in all
974 organisms. They are multi-domain proteins with at least two Cu binding sites (Rubino
975 and Franz, 2012). These proteins mediate the translocation of Cu across cellular
976 membranes, having a key function in managing the excretion of Cu excess from the cell
977 (La Fontaine and Mercer, 2007).

978 Fish are interesting and important organisms for monitoring the aquatic
979 environmental health, including the impact of metals (Santos et al., 2010). In fact, they
980 share similar metabolic pathways with other vertebrates. General effects of metal
981 contamination in fish include changes in body composition (Craig et al., 2007), as well
982 as in the levels of expression, quantity and activity of MT (Atli and Canli, 2008), metal-
983 transporting proteins (da Silva et al., 2014; Minghetti et al., 2010) and proteins
984 associated with oxidative stress (Atli and Canli, 2008; Machado et al., 2013). Also, it is

985 important to note that the genomic variation among locally adapted populations can
986 account for the phenotypic plasticity regarding gene expression (Whitehead et al.,
987 2011). Indeed, this can be taken as an evolutionary alternative for populations
988 inhabiting dynamic and/or contaminated environments.

989 The assessment of *in situ* effects of metals is very important to a better
990 understand on how these chemical elements can alter the metabolism of aquatic
991 organisms in a real world, once the influence of potential changes in water chemistry
992 are also taken into account over the experimental period (Walker et al., 2008).
993 Classically, laboratory mechanistic and toxicity tests allow us to access a limited
994 number of parameters. However, the interactive effect of complex metal mixtures may
995 alter the biological effects of these chemical elements in the field. In this context, the
996 Minas do Camaquã district (Caçapava do Sul city, Rio Grande do Sul state, southern
997 Brazil) is a natural scenario that bring us the opportunity to study how long-term metal
998 mining can affect aquatic populations. The mining activity in this region began in ~1870
999 and ended in 1996 (Ronchi and Lobato, 2000). Mining operations released great
1000 amounts of Cu, Fe, Mn, and other metals in the João Dias creek for more than a century
1001 (Bidone et al., 2001). In fact, despite the mining activities has stopped for
1002 approximately two decades, metal contamination can still be detected in the old mining
1003 area. Studies developed over the last 20 years have reported variable levels of Cu in
1004 waters of the João Dias creek. Concentrations are dependent on the distance from the
1005 mining area, and can vary from 9 to 179 µg/L (Bidone et al., 2001; Aldrovandi, 2012).

1006 *Hyphessobrycon luetkenii* is a small freshwater fish species (maximum body
1007 length = 7 cm) inhabitant subtropical rivers
1008 (<http://www.fishbase.us/summary/Hyphessobrycon-luetkenii.html>), including the
1009 João Dias creek (Konrad and Paloski, 2000). Considering its small size and likely high

1010 metabolism, *H.luetkenii* can be a suitable model organism to understand the
1011 biochemical/physiological/genetic adjustments in fish exposed to historically
1012 contaminated sites.

1013

1014 **2. Material and Methods**

1015

1016 *2.1 Environmental parameters*

1017 Water physicochemical parameters (temperature, pH and dissolved O₂) were
1018 monitored once a day during fish collection and the translocation experiments. Once a
1019 day, non-filtered and filtered (0.45-µm mesh filter) water samples were collected,
1020 acidified (final concentration: 1%) with 65% HNO₃ (Suprapur, Merck, Darmstadt,
1021 Germany), and stored at 4°C until analysis. Total (non-filtered water samples) and
1022 dissolved (filtered water samples) concentrations of carbon, major cations (Na, K and
1023 Ca) and metals (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) were analyzed. Carbon concentration was
1024 determined using a Total Organic Carbon (TOC) analyzer (5050A, Shimadzu, Japan)
1025 while cations and metals were analyzed using a High-Resolution Continuum Source
1026 Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer (HR-CS GF AAS, model Control-A
1027 700 Analytik Jena, Germany), equipped with AGS-GF and a transversely heated
1028 graphite tube atomizer. Pyrolytic graphite tubes with platforms were used. A Xe short-
1029 arc lamp (GLE, Berlin, Germany) in “hot-spot” mode was used as radiation source.
1030 Standard curves were built with standard solutions prepared by serial dilution of
1031 1000 mg/L stock solutions (Multi-Element Standards Certipur[®], Merck, Darmstadt,
1032 Germany). All reagents used were of high-purity grade. Water used for preparing all
1033 reagents and reference solutions was deionized and further purified using a Milli-Q
1034 system (Millipore Corp., Bedford, USA).

1035 *2.2. Fish collection and translocation*

1036 Male and female *H. luetkenii* were caught in a metal non-contaminated (n = 100;
1037 mean body length: 4.1 cm)) and in a metal contaminated (n = 90; mean body length: 4.3
1038 cm) of the João Dias creek using a fish trap. The two sites are approximately 7 km apart
1039 and separated by a man-made dam. Fish were then split into four experimental groups
1040 for the translocation experiment. Fish collected at the metal non-contaminated site were
1041 caged and kept at the site of collection (CC) or translocated, caged and kept at the metal
1042 contaminated site (CP) for 96 h. In turn, fish collected at the metal contaminated site
1043 were caged and kept at the site of collection (PP) or translocated, caged and kept at the
1044 metal non-contaminated site (PC) for 96 h. Fish cages (volume: 5,000 cm³) were built
1045 with PVC pipes and nylon nets. Fish were stocked at a density of <0.1 g fish/L. After
1046 the 96-h exposure time, fish were anesthetized with benzocaine, decapitated and had
1047 their tissues (gills, liver and intestine) dissected and immediately stored in RNA-later
1048 (Ambion, USA) following the manufacturer instructions.

1049

1050 *2.3 Identification of gene partial sequences and relative gene expression*

1051 Based on the conserved regions of the EF1 α , MTF-1, MT, ATP7A and CTR1
1052 gene sequences reported for the freshwater fish *Astyanax mexicanus* and other
1053 characiformes, primers were designed for *quantitative polymerase chain*
1054 *reaction (qPCR)*. Designed primers were used to determine the partial sequence, as well
1055 as the relative expression of target genes in gill, liver and intestine of fish kept at their
1056 respective collection site or translocated between the two fish collection sites (metal
1057 non-contaminated and contaminated sites). Total mRNA was extracted with Trizol
1058 (Ambion, USA), reverse transcribed with the High Capacity cDNA Reverse
1059 Transcription kit (Applied Biosystems, USA) and RNase inhibitor (Applied

1060 Biosystems, North America). All analyses were performed using the same amount of
1061 mRNA (1 µg/µL). The relative gene expression was quantified using real-time PCR
1062 using the GoTaq Kit (Promega, USA) and an ABI PRISM[®] 7300 machine (Applied
1063 Biosystems, USA). Results were normalized based on the EF1α gene expression and
1064 analysed using the 2^{-DCT} method (Schmittgen and Livak, 2008).

1065

1066 *2.4 Data presentation and statistical analysis*

1067 Data on physicochemical parameters in the two fish collection sites at the João
1068 Dias creek were compared using the Student *t* test. Data on total and dissolved carbon,
1069 major cation and metal concentrations were compared using One-Way Analysis of
1070 Variance (ANOVA) followed by Tukey test. Data on relative gene expression for each
1071 tissue were analyzed using the non parametric Kruskal Wallis test followed by the
1072 Dunn test. In all cases, the significance level adopted was 0.05 ($\alpha = 0.05$; 95%
1073 confidence interval).

1074

1075 *2.5 Ethics and legal statements*

1076 The present study and procedures adopted were approved by the University
1077 Commission for Ethics in Animal Use (CEUA; license # 23116.001365/2015-44) and
1078 the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio; license # 44769-1)
1079 of the Brazilian Ministry of Environment (MMA; Brasília, DF, Brazil).

1080

1081 **3. Results and Discussion**

1082 *3.1 Gene sequencing*

1083 Based on the whole transcriptome of *H.luetkenii* done by our group (non
1084 published data), were identified the whole coding sequences of MTF-1, MT, ATP7A

1085 and CTR1. Their identity was verified by the pairwise sequence alignment EMBOSS
1086 Needle (<https://www.ebi.ac.uk>) comparison with the nucleotide and amino acid
1087 sequences of the freshwater fish *A. mexicanus* (Table 1).

1088 The coding sequence of MTF-1 of *H.luetkenii* (Figure 1.) is a fragment
1089 of 2327 pb which shares an identity of 95,6% with the same gene of *A. mexicanus*
1090 (XM_007249610.2), the translated sequences between both species have an identity of
1091 95,5%. Analyzing the whole transcriptome of *H.luetkenii* were found six alternative
1092 sequences that can codify for MTs, these sequences can be isoforms or variants of this
1093 gene, nevertheless for this analysis was selected primary sequence that align with the *A.*
1094 *mexicanus* MT. A sequence of 305 pb (Figure 2.), these sequence have an identity of
1095 91.2% with the *A. mexicanus* MT (XM_007249200.2) nucleotide sequence whereas
1096 their translated products have a 84.9% of identity among their amino acid chains.

1097 By other hand, for CTR1 were found four alternative sequences in the whole
1098 transcriptome, in the same way that with MTs, was selected the sequence with higher
1099 similarity with the one reported for *A. mexicanus*. (XM_007231415.2) Figure 3. A
1100 sequence with 560 pb which shares an identity of 92.7% with the *A. mexicanus*
1101 nucleotide sequence and an identity of 93.2% with the translated sequenced of amino
1102 acids.

1103 A sequence of 4505 pb was found corresponding to the ATP7A transporter (Figure 4).
1104 This coding sequence is bigger than the one reported for *A. mexicanus*, because of this
1105 their identities in nucleotide and amino acid structure were lower than the ones found
1106 for the other genes (71,7% for both kind of alignments)

1107 Finally, it is important to highlight that even with alternative sequences for MT and
1108 CTR1, the results of qPCR evidenced the primers used in this study amplify one
1109 specific fragment in each situation (Table 2).

1110 *3.3 Characterization of the sites of fish collection and the translocation experiment*

1111 Data on environmental parameters showed no significant differences in water
1112 pH and dissolved oxygen content at the two sites of fish collection and where the
1113 translocation experiment was performed. In fact, only a slightly difference in mean
1114 higher water temperature between the two sites was observed. It was 2.2°C higher at the
1115 contaminated site than at the non-contaminated site (Table 3). This could be explained
1116 by the fact that the non-contaminated site is approximately 7 km closer to the João Dias
1117 creek spring than the contaminated site. Concentrations of organic matter (total and
1118 dissolved carbon), major cations (Na, K and Ca) and metals (Cd, Fe, Mn, Pb and Zn)
1119 were not significant different between the non-contaminated and the contaminated sites.
1120 However, mean total and dissolved Cu concentration was 3.4-fold higher at the
1121 contaminated site than at the non-contaminated site (Table 4). As expected, the higher
1122 Cu concentration found at the contaminated site is in complete agreement with previous
1123 monitoring studies performed in the João Dias creek at Minas do Camaquã (Caçapava
1124 do Sul city, Rio Grande do Sul state, southern Brazil). According to Ronchi and Lobato
1125 (2000), Cu mining in this area was active for more than a century (1870-1996),
1126 releasing great amounts of Cu, Fe, Mn, and other metals in the João Dias creek (Bidone
1127 et al., 2001). In the present study, performed more than two decades after the mining
1128 activities have been stopped, mean total Cu concentrations in waters of the João Dias
1129 creek were 2.94 and 10.18 µg/L at the non-contaminated site and the contaminated site,
1130 respectively. It is important to note that the non-contaminated site is located
1131 approximately 7 km upstream the old mining area, while the contaminated site is
1132 located very close to the old mining area. Therefore, our results are in complete
1133 agreement with these previous studies on metal contamination monitoring at the João
1134 Dias creek. In fact, studies developed over the last two decades have reported

1135 significant high concentrations of total Cu in waters of the João Dias creek, with these
1136 concentrations varying from 9 to 179 µg/L, depending on the distance from the mining
1137 area (Bidone et al., 2001; Aldrovandi, 2012).

1138

1139 *3.4 Relative gene expression in fish gills*

1140 Gills are the main route for metal uptake in freshwater fish (Hansen et al., 2007).
1141 Therefore, stress associated with waterborne metal contamination can affect the
1142 expression of genes involved in metal regulation. However, despite the significant
1143 difference in total or dissolved Cu concentration between the two sites of fish collection
1144 in the João Dias creek, MTF-1 expression was similar in all experimental groups tested
1145 (Fig. 5.a).

1146 MT is the main mechanism of defense against metal toxicity in fish. Indeed, MT
1147 relative expression was significantly higher (3.5-fold) in fish collected and kept caged at
1148 the Cu contaminated site (PP) than in those collected and kept caged at the non-
1149 contaminated site (CC). Additionally, a significant down regulation (4.8-fold) in the
1150 relative expression of MT gene was observed in fish collected at the Cu contaminated
1151 site (PP) and translocated to the non-contaminated site (CC) (Fig. 5.b). On the other
1152 hand, no significant changes were observed in fish of the CP group. This could be due,
1153 at least in part, by the production of mucus in gills, which can protect fish against an
1154 excessive uptake of metal (Hansen et al., 2007). These findings indicate that an active
1155 regulation of the MT gene expression is occurring in the freshwater fish *H.luetkenii* to
1156 deal with the higher waterborne Cu contamination. Also, it can suggest that the stress
1157 generated by metal contamination in fish from the Cu contaminated site would be
1158 counteracted by the observed responses in MT gene expression, which are aimed to
1159 enhance the detoxification of tissue Cu accumulation in *H.luetkenii*. This response may

1160 indicate that both fish communities living and Cu contaminated and non-contaminated
1161 sites can belong to the same population.

1162 Regarding the expression of the two genes encoding for metal-transporting
1163 proteins (ATP7A - Fig. 5.c; CTR1 - Fig. 5.d), no clear differences in gene expression
1164 were observed between the two fish communities evaluated or associated with the
1165 translocation experiment. Despite this, fish of the PP group showed a significantly
1166 higher expression of genes encoding for both transporters. The observed higher
1167 expression of the gene encoding for CTR1 in fish of the PP group is evidence a possible
1168 higher Cu uptake in fish of the PP and PC groups (Fig. 5.d). This would result in a
1169 potentially higher Cu accumulation in fish gills, as demonstrate for *D. rerio* (Craig et al.
1170 2009). Also, other acute experiments have evidenced that exposure to Cu and or metal
1171 mixtures containing Fe can induce the expression of ATP7A and CTR1 at low metal
1172 concentrations (Craig et al., 2009; Leung et al., 2014). Nevertheless, a down regulation
1173 of the expression of genes encoding for these transporters was reported for the estuarine
1174 fish *P. vivipara* at higher levels of Cu (20µg/L) (da Silva et al., 2014).

1175 At this point, it is worth noting that the patterns of MT, ATP7A and CTR1 gene
1176 expression were similar, with the highest levels of gene expression being observed in
1177 fish of the PP group for all genes evaluated. Additionally, the lowest levels of
1178 expression were observed for the genes encoding for the two metal-transporting proteins
1179 (ATP7A and CTR1) in fish of the CP group. Furthermore, there were no significant
1180 differences in the expression of any gene evaluated in fish of PP and PC groups.

1181

1182 *3.5 Relative gene expression in fish liver*

1183 Liver is the main organ involved in metal detoxification. In hepatic and non-
1184 hepatic cells, MTF-1 is a transcription factor implicated in the metabolism of several

1185 metals. Our results show a markedly higher basal MTF-1 gene expression (12.2-fold) in
1186 fish of the CC group with respect to fish of the PP and PC groups (11.5-fold). However,
1187 no significant differences were associated with the translocation experiment (Fig. 6a).
1188 Whereas the activity of MTF-1 and the regulation of other genes by this transcription
1189 factor have been widely studied, MTF-1 gene expression under metal stress has been
1190 poorly studied, especially in fish. The higher MTF-1 gene expression observed in fish of
1191 the CC group can be explained considering the need for a regulation of several genes
1192 associated with metal metabolism, such as CTR1. This would be especially important in
1193 fish living in an environment enriched with Cu, such as the portion of the João Dias
1194 creek close to the old Cu mining area (Table 4). It is worth noting that Cu is a divalent
1195 metal directly implicated in MTF-1 regulation (Heuchel et al., 1994).

1196 In freshwater species, a positive correlation between MT and Zn or Cu is
1197 reported (Bervoets et al., 2013). Indeed, our results show a significant induction of MT
1198 gene expression in fish of the CP group (3.5-fold; Figure 6.b) associated with the area of
1199 the João Dias creek showing higher concentrations of total and dissolved Cu (Table 4).
1200 This finding is evidence of the activation of a protective mechanism displayed by
1201 hepatic cells to prevent against the toxicity of a potentially higher liver uptake of Cu due
1202 to the higher environmental levels of bioavailable waterborne Cu in the contaminated
1203 area of the João Dias creek. In this case, MT would act as a Cu scavenger (Wijmenga and
1204 Klomp, 2004).

1205 Differently from CTR1, no significant changes in ATP7A gene expression was
1206 observed for any of the fish groups evaluated (Figure. 6.c). This is a different response
1207 from that reported in other previous studies, which showed that ATP7A gene expression
1208 is highly inducible in liver after acute exposure to Cu at low concentrations (Craig et al.,
1209 2009; Leung et al., 2014) . In this case, it is important to note that despite no significant

1210 changes in ATP7A gene expression were observed, possible changes in gene expression
1211 of ATP7B, an isoform that play the same role of ATP7A in liver, cannot be ruled out. In
1212 fact, this has been reported for mammal liver, where ATP7B is the predominant isoform
1213 of the metal-transporting protein (La Fontaine and Mercer, 2007).

1214 CTR1 gene expression was significantly reduced (2.4-fold) in fish of the CP
1215 group respect with those from the CC group or even those of the PP and PC groups
1216 (Figure. 6.c). This finding confirms the expected key role of CTR1 in Cu uptake in fish
1217 hepatocytes (Wijmenga and Klomp, 2004). In this case, a down regulation of CTR1
1218 gene expression would be a mechanism to prevent against an excessive uptake of Cu in
1219 hepatic cells.

1220

1221 *3.6 Relative gene expression in fish intestine*

1222 Intestine is a key organ for a better understanding of the mechanisms involved in
1223 uptake, regulation and toxicity of essential metals like Cu in fish. This is associated with
1224 the potential metal accumulation associated with dietborne contamination. The pattern
1225 of MTF-1 gene expression in intestine was similar to than observed in liver. In this case,
1226 fish of the CC group showed the highest level of MTF-1 gene expression (4.8-fold
1227 higher than fish of the PP group). Additionally, MTF-1 gene expression was down
1228 regulated in fish of the CP group (2.5-fold) and no significant difference was observed
1229 between fish of the PP and PC groups (Figure 7.a). Therefore, our findings on gene
1230 expression in fish of the CC and CP groups are evidence of an ability of *H.luetkenii*
1231 living in the Cu contaminated area of the João Dias creek to efficiently handle the stress
1232 associated with the exposure to complex mixtures of metals by regulating MTF-1 gene
1233 expression.

1234 On the other hand, the significant induction of MT gene expression in fish of the
1235 CP group (6.1-fold) with respect to those of the CC group is a classical response of MT
1236 to fish exposure to sublethal levels of Cd, Cu, Hg, and Zn, in order to enhance MT
1237 synthesis aiming to protect cells against metal toxicity (Hamilton and Mehrle, 1986)
1238 (Figure 7.b). In our experiment, this response seems to be associated with the
1239 significantly higher levels of Cu observed in the Cu contaminated area of the João Dias
1240 creek (Table 4). Despite a strong dependence of MT expression on MTF-1 expression
1241 was reported in flies and mammals (Selvaraj et al., 2005; Balamurugan and Schaffner,
1242 2006; Günther et al., 2012), this relationship was not seem in any tissue (gills, liver and
1243 intestine) of the freshwater fish *H.luetkenii* exposed to any of the experimental
1244 condition tested in the present study.

1245 No significant changes in intestine ATP7A or CTR1 gene expression were
1246 observed in association with the translocation experiment (Figure 7. c and 7. d).
1247 Therefore, the lowest mean ATP7A gene expression observed in intestine of fish of the
1248 PC group would suggest a lower need for Cu excretion in this fish group. Additionally,
1249 a markedly higher (3.0-fold) level of CTR1 gene expression was observed in intestine
1250 of fish of the CC group than in intestine of fish of the PP group. This finding can be
1251 explained by the need of fish from the non-contaminated site to incorporate Cu through
1252 diet, thus displaying a larger number of CTR1 transporting units in their intestinal
1253 epithelium. Indeed, the expression of both ATP7A and CTR1 in freshwater fish
1254 intestine is reported to be highly dependent on the environmental Cu availability,
1255 especially when fish are exposed to Cu in a mixture with other metals, such as Fe (Craig
1256 et al., 2009; Leung et al., 2014).

1257

1258

1259 **4. Conclusion**

1260

1261 Our findings provide evidence that plastic responses in gene regulation are
1262 occurring in the freshwater fish *H. luetkenii* as a response to chronic exposure to Cu
1263 contamination associated with a century of mining activities at Minas do Camaquã
1264 district in southern Brazil. This statement is based on the fact that there were significant
1265 differences in the expression of MTF-1 in liver and intestine between the fish from a
1266 Cu-contaminated site and fish from a non-contaminated site. Also, the facts that gene
1267 expression regulation reached intermediate values and MT gene expression was induced
1268 in liver and intestine of fish translocated from the metal non-contaminated site to the
1269 metal contaminated site are clear evidences of the activation of genes involved in fish
1270 protection against the potential toxicity associated with an excessive Cu accumulation.
1271 Additionally, the fact that CTR1 gene expression was down regulated in liver and
1272 intestine of fish living in the site historically contaminated with Cu or translocated from
1273 the non-contaminated site to the contaminated site is a clear evidence of fish response in
1274 order to reduce Cu intake in waters enriched with the metal.

1275

1276 **5. Acknowledgements**

1277

1278 This study was supported by grants from the Agencies INCT- Aquatic
1279 Toxicology (CNPq, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia
1280 Aquática, Brasília, DF, Brazil. grant # 573949/2008-5), CAPES (CAPES, Brasília, DF,
1281 Brazil, grant # 230/2010), IDRC (Ottawa, ON, Canada, grant # 104519-027) . We thank
1282 to the Institute of Biological Sciences and the Laboratory of Molecular Biology of the
1283 Universidad Federal do Rio Grande and the Laboratory of Ökologische Genomics of the

1284 Carl von Ossietzky Universität Oldenburg. Special thanks to the Dr. Arne Nolte for the
1285 scientific support and the Dr. Mariana Lauer, the MsC. Vinicius Dias and the Biologist
1286 Gilson Junior Cordeiro by the help during the field experiment.

1287

1288 **6. Conflict of interest**

1289

1290 Authors declare no *conflict of interest*.

1291

1292 **7. References**

1293 Aldrovandi, P., 2012. Avaliação da contaminação por metais na área das Minas do

1294 Camaquã. <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/64071>

1295 Andrews, G.K., 2001. Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression.

1296 *Biometals* 14, 223-237. doi:10.1023/A:1012932712483

1297 Atli, G., Canli, M., 2008. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a
1298 freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Environ.*

1299 *Toxicol. Pharmacol.* 25, 33-38. doi:10.1016/j.etap.2007.08.007

1300 Balamurugan, K., Schaffner, W., 2006. Copper homeostasis in eukaryotes: Teetering on

1301 a tightrope. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Cell Biology of*

1302 *Metals* 1763, 737-746. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.001

1303 Bervoets, L., Knapen, D., Jonge, M.D., Campenhout, K.V., Blust, R., 2013. Differential

1304 hepatic metal and metallothionein levels in three feral fish species along a metal

1305 pollution gradient. *PLOS ONE* 8, e60805. doi:10.1371/journal.pone.0060805

1306 Bidone, E.D., Laybauer, L., Castilhos, Z.C., Maddock, J.L., 2001. Environmental risk

1307 increase due to heavy metal contamination caused by a copper mining activity in

1308 Southern Brazil. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 73, 277-286. doi:10.1590/S0001-

1309 37652001000200011

1310 Craig, P.M., Galus, M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2009. Dietary iron alters
1311 waterborne copper-induced gene expression in soft water acclimated zebrafish
1312 (*Danio rerio*). Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. 296, R362-R373.
1313 doi:10.1152/ajpregu.90581.2008

1314 Craig, P.M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2007. Oxidative stress response and gene
1315 expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). Am. J.
1316 Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. 293, R1882-R1892.
1317 doi:10.1152/ajpregu.00383.2007

1318 da Silva, E.S., Abril, S.I.M., Zanette, J., Bianchini, A., 2014. Salinity-dependent copper
1319 accumulation in the guppy *Poecilia vivipara* is associated with CTR1 and
1320 ATP7B transcriptional regulation. Aquat. Toxicol. 152, 300-307.
1321 doi:10.1016/j.aquatox.2014.04.024

1322 Giedroc, D.P., Chen, X., Apuy, J.L., 2001. Metal response element (MRE)-binding
1323 transcription factor-1 (MTF-1): Structure, function, and regulation. Antioxid.
1324 Redox Signal. 3, 577-596. doi:10.1089/15230860152542943

1325 Günther, V., Lindert, U., Schaffner, W., 2012. The taste of heavy metals: Gene
1326 regulation by MTF-1. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Cell
1327 Biology of Metals 1823, 1416-1425. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.01.005

1328 Hamilton, S.J., Mehrle, P.M., 1986. Metallothionein in fish: Review of its importance in
1329 assessing stress from metal contaminants. Trans. Am. Fish. Soc. 115, 596-609.
1330 doi:10.1577/1548-8659(1986)115<596:MIF>2.0.CO;2

1331 Hansen, B.H., Garmo, Ø.A., Olsvik, PÅ.A., Andersen, R.A., 2007. Gill metal binding
1332 and stress gene transcription in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to metal
1333 environments: The effect of pre-exposure in natural populations. Environ.
1334 Toxicol. Chem. 26, 944-953. doi:10.1897/06-380R.1

- 1335 Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M., Schaffner, W., 1994. The
1336 transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced
1337 metallothionein gene expression. *EMBO J.* 13, 2870-2875.
- 1338 Hogstrand, C., Zheng, D., Feeney, G., Cunningham, P., Kille, P., 2008. Zinc-controlled
1339 gene expression by metal-regulatory transcription factor 1 (MTF1) in a model
1340 vertebrate, the zebrafish. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1252-1257.
1341 doi:10.1042/BST0361252
- 1342 La Fontaine, S., Mercer, J.F.B., 2007. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and
1343 ATP7B: Role in copper homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.*, Highlight
1344 Section: Copper and zinc in cell signaling and disease 463, 149-167.
1345 doi:10.1016/j.abb.2007.04.021
- 1346 Leung, K.P., Chen, D., Chan, K.M., 2014. Understanding copper sensitivity in zebrafish
1347 (*Danio rerio*) through the intracellular localization of copper transporters in a
1348 hepatocyte cell-line ZFL and the tissue expression profiles of copper
1349 transporters. *Metallomics* 6, 1057-1067. doi:10.1039/C3MT00366C
- 1350 Machado, A.A.S., Hoff, M.L.M., Klein, R.D., Cardozo, J.G., Giacomini, M.M., Pinho,
1351 G.L.L., Bianchini, A., 2013. Biomarkers of waterborne copper exposure in the
1352 guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. *Aquat. Toxicol.* 138-139, 60-
1353 69. doi:10.1016/j.aquatox.2013.04.009
- 1354 Maur, A.A. der, Belser, T., Elgar, G., Georgiev, O., Schaffner, W., 2005.
1355 Characterization of the transcription factor MTF-1 from the Japanese Pufferfish
1356 (*Fugu rubripes*) reveals evolutionary conservation of heavy metal stress
1357 response. *Biol. Chem.* 380, 175-185. doi:10.1515/BC.1999.026
- 1358 Minghetti, M., Leaver, M.J., George, S.G., 2010. Multiple Cu-ATPase genes are
1359 differentially expressed and transcriptionally regulated by Cu exposure in sea

1360 bream, *Sparus aurata*. *Aquat. Toxicol.* 97, 23-33.
1361 doi:10.1016/j.aquatox.2009.11.017

1362 Otsuka, F., 2001. Molecular mechanism of the metallothionein gene expression
1363 mediated by metal-responsive transcription factor 1. *J. Health Sci.* 47, 513-519.
1364 doi:10.1248/jhs.47.513

1365 Ronchi, L.H., Lobato, A.O.C., 2000. Avaliação do estado da qualidade das águas e da
1366 contaminação dos sedimentos recentes do arroio João Dias após encerramento
1367 das atividades das minas do Camaquã, RS. In: Ronchi, L.H., Lobato, A.O.C
1368 (eds). *Minas do Camaquã, um Estudo Multidisciplinar*. UNISINOS, Canoas, RS,
1369 Brazil.

1370 Rubino, J.T., Franz, K.J., 2012. Coordination chemistry of copper proteins: How nature
1371 handles a toxic cargo for essential function. *J. Inorg. Biochem.* 107, 129-143.
1372 doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024

1373 Santos, E.M., Ball, J.S., Williams, T.D., Wu, H., Ortega, F., van Aerle, R., Katsiadaki,
1374 I., Falciani, F., Viant, M.R., Chipman, J.K., Tyler, C.R., 2010. Identifying health
1375 impacts of exposure to copper using transcriptomics and metabolomics in a fish
1376 model. *Environ. Sci. Technol.* 44, 820-826. doi:10.1021/es902558k

1377 Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative
1378 CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101-1108. doi:10.1038/nprot.2008.73

1379 Selvaraj, A., Balamurugan, K., Yepiskoposyan, H., Zhou, H., Egli, D., Georgiev, O.,
1380 Thiele, D.J., Schaffner, W., 2005. Metal-responsive transcription factor (MTF-1)
1381 handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different
1382 genes. *Genes Dev.* 19, 891-896. doi:10.1101/gad.1301805

1383 Walker, P.A., Kille, P., Hurley, A., Bury, N.R., Hogstrand, C., 2008. An *in vitro* method
1384 to assess toxicity of waterborne metals to fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230,
1385 67-77. doi:10.1016/j.taap.2008.02.012

1386 Whitehead, A., Galvez, F., Zhang, S., Williams, L.M., Oleksiak, M.F., 2011. Functional
1387 genomics of physiological plasticity and local adaptation in killifish. *J. Hered.*
1388 102, 499-511. doi:10.1093/jhered/esq077

1389 Wijmenga, C., Klomp, L.W.J., 2004. Molecular regulation of copper excretion in the
1390 liver. *Proc. Nutr. Soc.* 63, 31-39.

1391

1392

1393

1394

1395

1396

1397

1398

1399

1400

1401

1402

1403

1404

1405

1406

1407

1408 **Tables**

1409 **Table 1.** Percentage of identity among nucleotidic and aminoacid sequences of metal
 1410 transcription factor (MTF-1), metallothionein (MT) and copper-transporting proteins
 1411 (ATP7A and CTR1) in the freshwater fish *Hyphessobrycon luetkenii*, compared against the
 1412 sequences reported for the fish *Astyanax mexicanus*.

1413

Sequence	pb	% identity of nucleotides	% identity of amino acids
MTF-1	2327	95.6	95.5
MT	305	91.2	84.9
CTR1	560	92.7	93.2
ATP7A	4505	71.7	71.7

1414

1415 **Table 2.** List of primers designed for *quantitative polymerase chain reaction (qPCR)*
 1416 and partial sequencing in the freshwater fish *Hyphessobrycon luetkenii*.

1417

Name	Primer sequence
EF1aAsF	ATCATCCTGAACCACCCTG
EF1aAsR	ATGGCAGCATCTCCAGAC
MTF1As_qF	GGGAAGACATTTAACTGTGAATCAGA
MTF1As_qR	TGACTAGCAGCAAAAAGCCTTAC
MetAs_qF1	ATGGATCCCTGTGACTGCG
MetAs_qR1	TTTCTTGCAGGATGTGCACTG
CTR1As_qF	ATGTGGAGCTGCTCTTTGCT
CTR1As_qR1	CGATCTTCAGCCCCTCGTAG
ATP7AAs_qF1	ATGGGTCTGGAAGTGGTGC
ATP7A/BAs_qR1	GCAAACACCTTCCTGATGCC

1418

1419 **Table 3.** Physicochemical parameters of water samples from the control and polluted
 1420 sites at the João Dias creek (Caçapava do Sul city, Rio Grande do Sul state, southern
 1421 Brazil). DO: dissolved oxygen content. * indicates significant different mean value
 1422 between sampling sites (n = 10; Student *t* test; P<0.05).

Parameter	Control	Polluted
Temperature (°C)	24.6 ± 0.39	26.8 ± 0.37*
pH	5.08 ± 0.06	5.02 ± 0.02
DO (mg O ₂ /L)	7.07 ± 0.10	6.95 ± 0.11

1423

1424 **Table 4.** Carbon, major cation and metal concentrations in water samples from the
 1425 control and polluted sites at the João Dias creek (Caçapava do Sul city, Rio Grande do
 1426 Sul state, southern Brazil). Data are means ± standard error (n = 10). Different letters
 1427 indicate significant different mean values among conditions (ANOVA followed by
 1428 Tukey test; P<0.05).

Parameter	Control		Polluted	
	Total	Dissolved	Total	Dissolved
C (mg/L)	7.90 ± 0.56 ^a	5.88 ± 0.53 ^b	7.99 ± 0.59 ^a	4.00 ± 0.66 ^b
Na (mg/L)	4.60 ± 0.34 ^a	2.70 ± 0.40 ^{bc}	3.50 ± 0.43 ^{ab}	1.70 ± 0.33 ^c
K (mg/L)	0.81 ± 0.10 ^a	0.46 ± 0.07 ^b	0.59 ± 0.08 ^{ab}	0.29 ± 0.07 ^b
Ca (mg/L)	1.15 ± 0.44 ^{ab}	0.35 ± 0.05 ^a	1.79 ± 0.43 ^b	0.62 ± 0.24 ^a
Mg (mg/L)	0.99 ± 0.26 ^a	0.66 ± 0.17 ^a	0.92 ± 0.14 ^a	0.85 ± 0.10 ^a
Cd (µg/L)	6.43 ± 0.24 ^a	4.27 ± 0.30 ^b	5.58 ± 0.41 ^a	3.13 ± 0.30 ^b
Cu (µg/L)	2.94 ± 0.95 ^{ab}	1.21 ± 0.71 ^a	10.18 ± 1.48 ^c	4.10 ± 0.52 ^b
Fe (mg/L)	1.83 ± 0.44 ^a	0.53 ± 0.10 ^b	2.61 ± 1.98 ^a	0.53 ± 0.12 ^b
Mn (µg/L)	25.17 ± 2.42 ^a	18.11 ± 2.87 ^a	32.73 ± 4.13 ^a	27.29 ± 4.04 ^a
Pb (µg/L)	19.55 ± 2.06 ^a	9.21 ± 2.58 ^b	17.34 ± 2.75 ^a	11.54 ± 1.59 ^{ab}
Zn (µg/L)	1.73 ± 0.40 ^{ab}	0.71 ± 0.23 ^a	2.57 ± 0.59 ^b	1.03 ± 0.35 ^{ab}

1429

1430 **Figure Captions**

1431

1432 **Figure 1. Metal regulatory transcription factor (MTF-1) of *Hyphessobrycon luetkenii*,**
1433 nucleotide sequence aligned against the MTF-1 of *A. mexicanus* (XM_007249610.2) (alignment
1434 done by SEAVIEW)

1435

1436 **Figure 2. Metallothionein (MT) of *Hyphessobrycon luetkenii*,** nucleotide sequence aligned
1437 against the MT of *A. mexicanus* (XM_007249200.2) (alignment done by SEAVIEW)

1438

1439 **Figure 3. Copper transporter CTR1 of *Hyphessobrycon luetkenii*,** nucleotide sequence
1440 aligned against the CTR1 of *A. mexicanus* (XM_007231415.2) (alignment done by
1441 SEAVIEW)

1442

1443 **Figure 4. ATP7A transporter of *Hyphessobrycon luetkenii*,** nucleotide sequence aligned
1444 against the ATP7A of *A. mexicanus* (XM_007253627.2) (alignment done by SEAVIEW)

1445

1446 **Figure 5.** Relative gene expression in gills of the freshwater fish *Hyphessobrycon luetkenii* after
1447 96 h of field translocation experiment. Gene expression was determined by *quantitative*
1448 *polymerase chain reaction (qPCR)* using the elongation factor alpha (EF α) as housekeeping
1449 gene and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Experimental groups: CC = fish collected and kept caged at the
1450 control site; CP = fish collected at the control site and translocated to the polluted site; PP = fish
1451 collected and kept caged at the polluted site; PC = fish collected at the polluted site and
1452 translocated to the control site. (a) Metal regulatory transcription factor transcription factor (MTF-
1453 1); (b) metallothionein (MT); (c) ATP7A; and (d) CTR1. Data are expressed as mean \pm standard
1454 error. Mean values for the different experimental groups were compared using the Kruskal Wallis
1455 test followed by Dunn multiple comparison test ($P < 0.05$).

1456 **Figure 6.** Relative gene expression in liver of the freshwater fish *Hyphessobrycon*
1457 *luetkenii* after 96 h of field translocation experiment. Gene expression was determined
1458 by *quantitative polymerase chain reaction (qPCR)* using the elongation factor alpha
1459 (EF α) as housekeeping gene and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Experimental groups: CC = fish
1460 collected and kept caged at the control site; CP = fish collected at the control site and
1461 translocated to the polluted site; PP = fish collected and kept caged at the polluted site;
1462 PC = fish collected at the polluted site and translocated to the control site. (a) Metal
1463 regulatory transcription factor transcription factor (MTF-1); (b) metallothionein (MT);
1464 (c) ATP7A; and (d) CTR1. Data are expressed as mean \pm standard error. Mean values
1465 for the different experimental groups were compared using the Kruskal Wallis test
1466 followed by Dunn multiple comparison test ($P < 0.05$).

1467

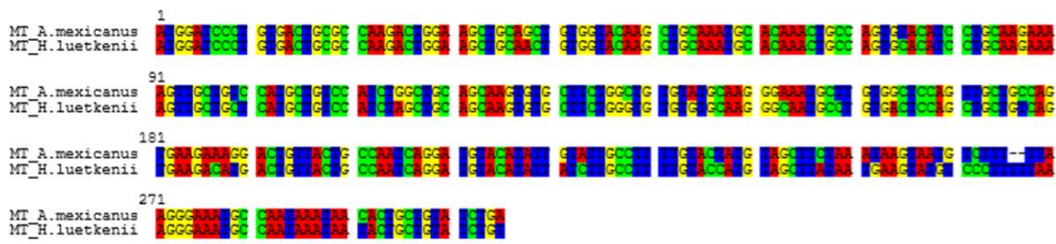
1468 **Figure 7.** Relative gene expression in intestine of the freshwater fish *Hyphessobrycon*
1469 *luetkenii* after 96 h of field translocation experiment. Gene expression was determined
1470 by *quantitative polymerase chain reaction (qPCR)* using the elongation factor alpha
1471 (EF α) as housekeeping gene and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Experimental groups: CC = fish
1472 collected and kept caged at the control site; CP = fish collected at the control site and
1473 translocated to the polluted site; PP = fish collected and kept caged at the polluted site;
1474 PC = fish collected at the polluted site and translocated to the control site. (a) Metal
1475 regulatory transcription factor transcription factor (MTF-1); (b) metallothionein (MT);
1476 (c) ATP7A; and (d) CTR1. Data are expressed as mean \pm standard error. Mean values
1477 for the different experimental groups were compared using the Kruskal Wallis test
1478 followed by Dunn multiple comparison test ($P < 0.05$).

1479

1480

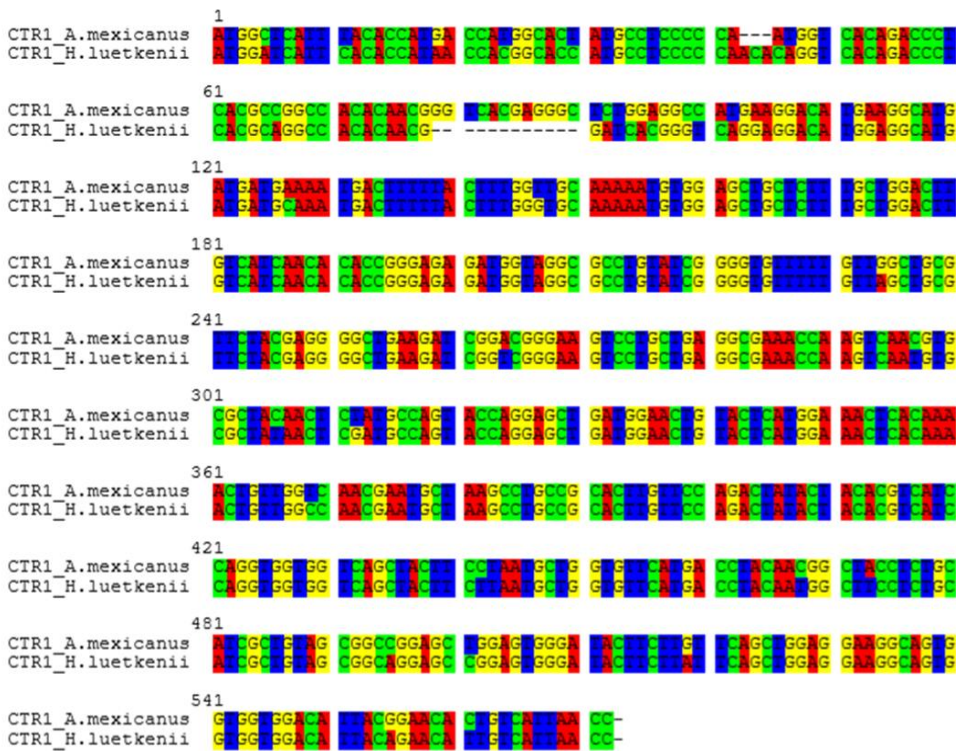
1481

1489 **Figure 2**



1490

1491 **Figure 3**



1492

1493

1494

1495

1496

1497

1498

1499

1500

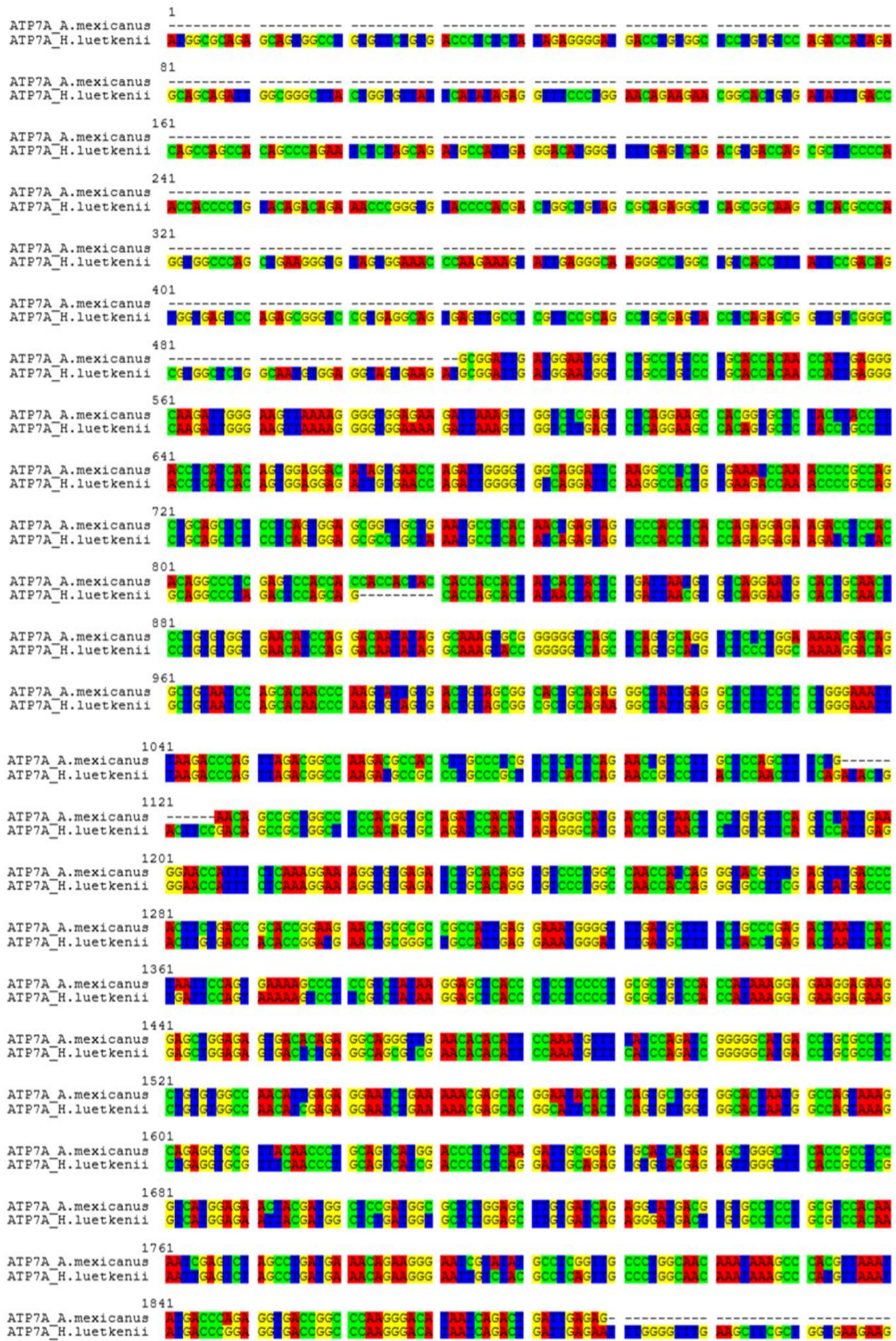
1501

1502

1503

1504

1505 **Figure 4**



1506

1507

1508

1509

1921
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2001
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2081
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2161
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2241
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2321
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2401
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2481
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2561
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2641
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2721
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2801
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2881
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

2961
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

3041
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

3121
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

3201
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

3281
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

3361
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

3441
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

3521
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

3601
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

3681
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

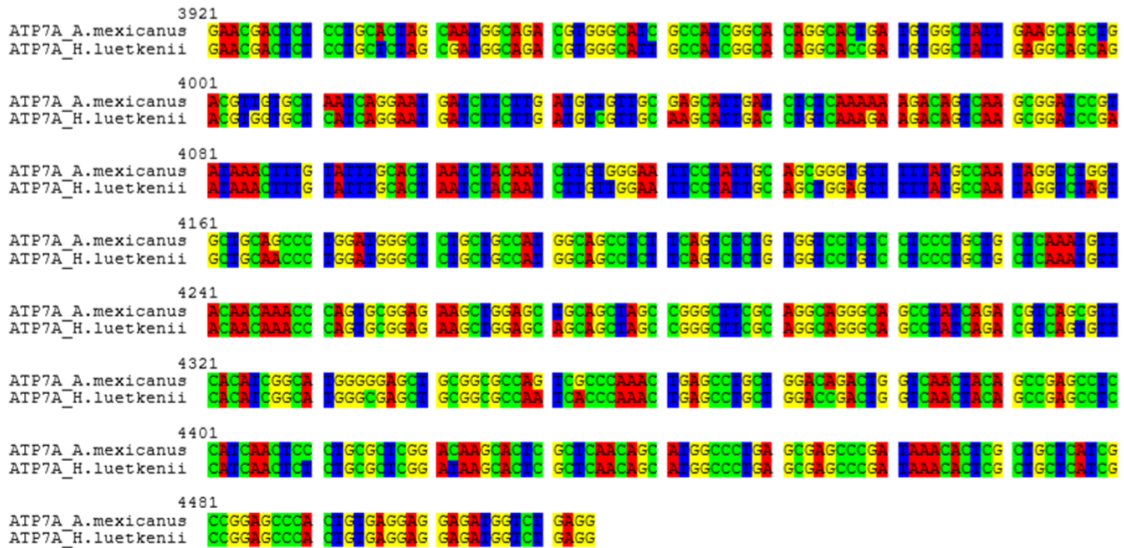
3761
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

3841
ATP7A_A.mexicanus
ATP7A_H.luetkenii

1510

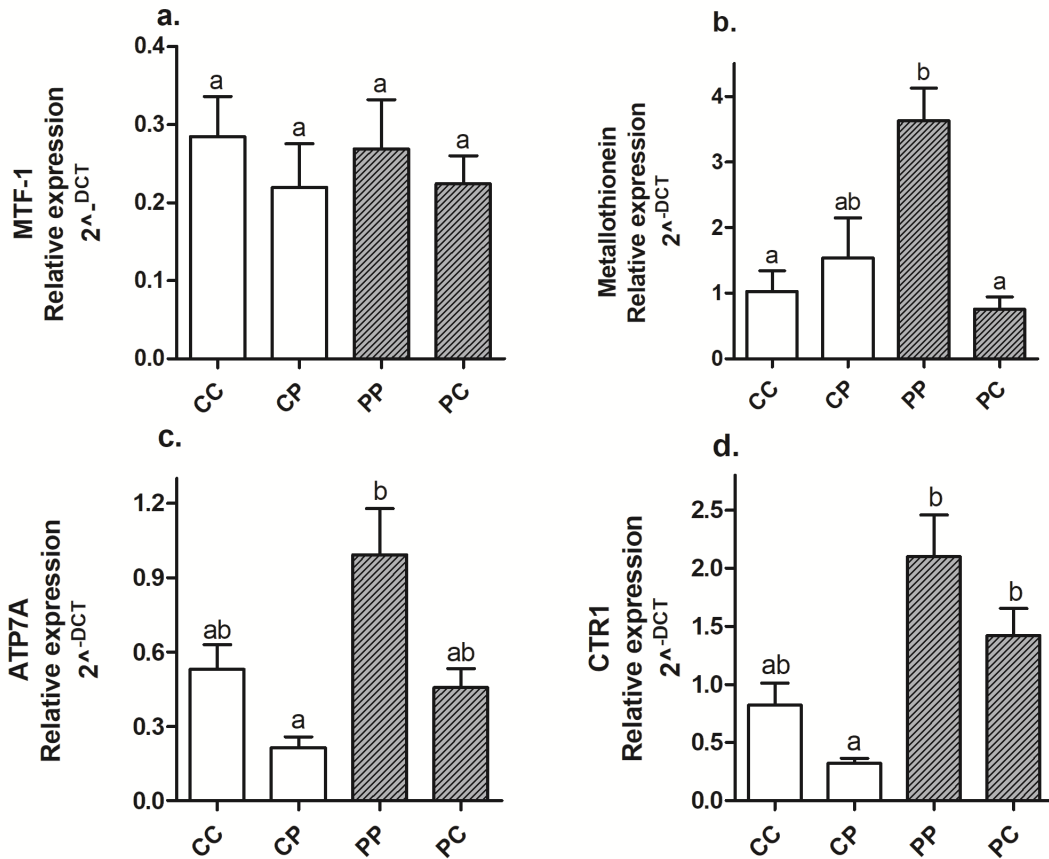
1511

1512



1513

1514 **Figure 5**



1515

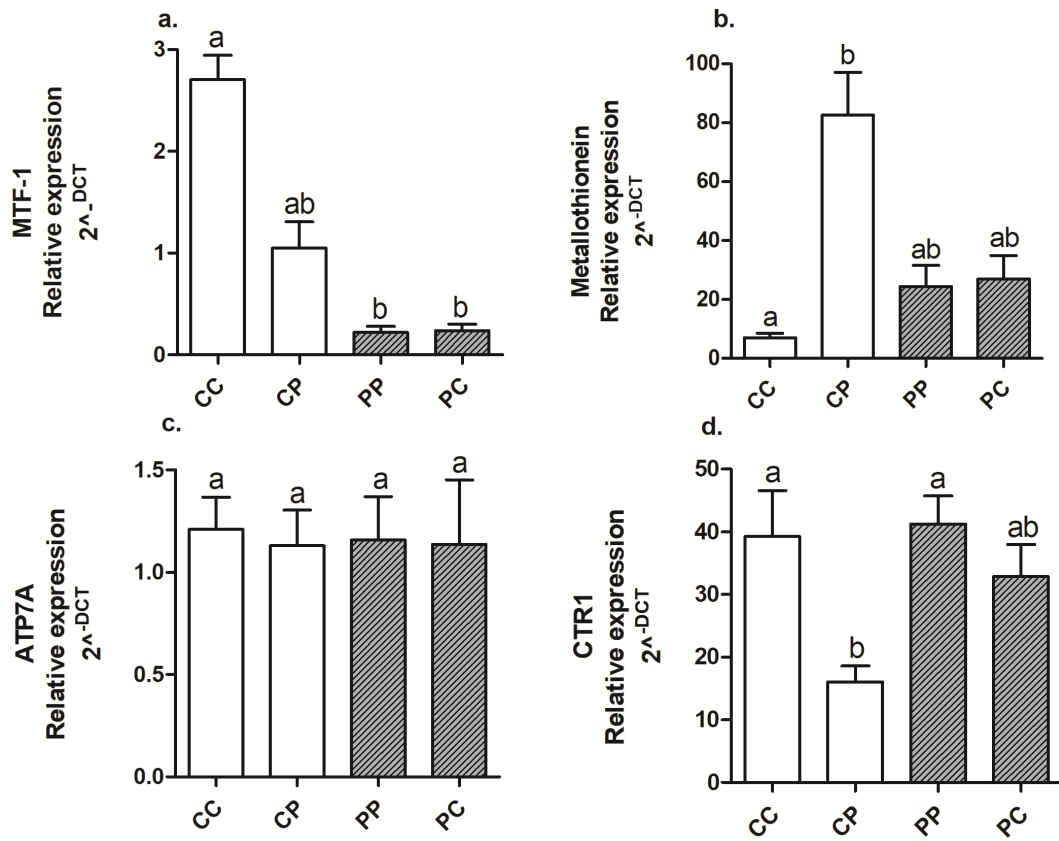
1516

1517

1518

1519

1520 **Figure 6**



1521

1522

1523

1524

1525

1526

1527

1528

1529

1530

1531

1532

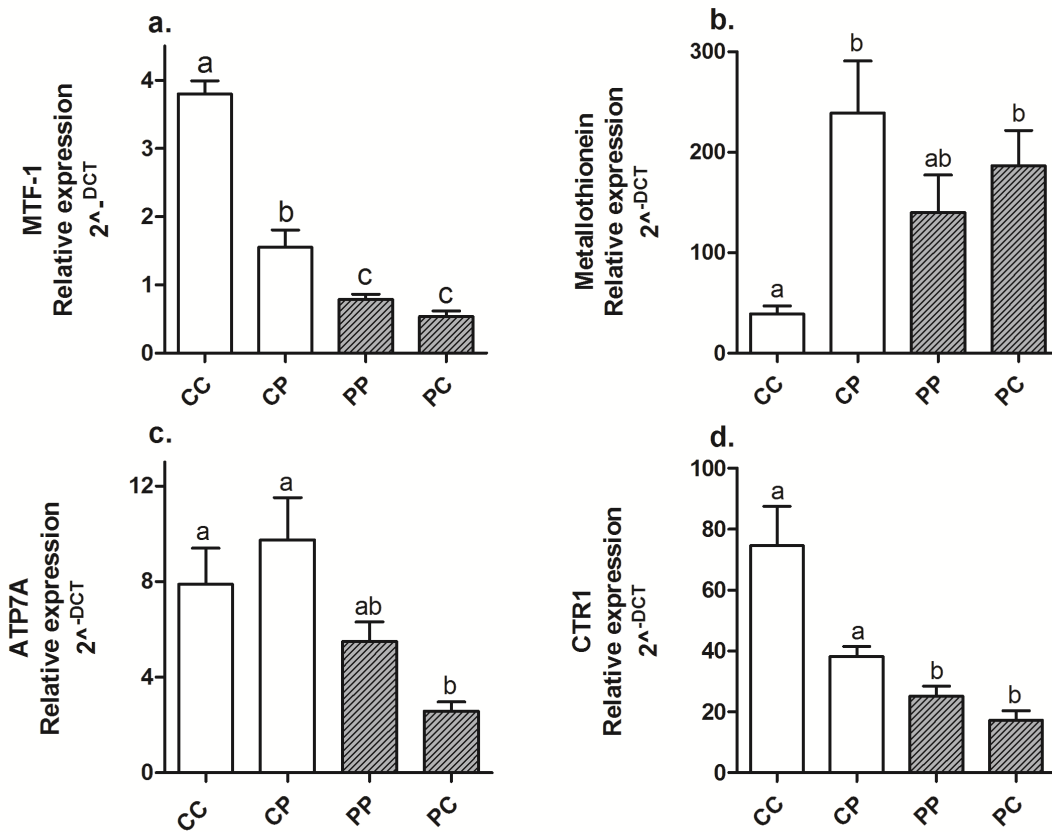
1533

1534

1535

1536

1537



1539

1540 **Highlights**

- 1541 • Differences between both populations are the result of regulatory processes
- 1542 • Significant changes due to translocation are associated with protective mechanisms
- 1543
- 1544 • The most significant changes associated to translocation were in organism of
- 1545 “control” place
- 1546 • MTF-1, MT and CTR1 were the genes that evidenced the most significant
- 1547 differences

1548

1549

1550

1551

1552

1553

1554

1555

Capítulo 3

1556 (Artigo a ser submetido no Journal of Environmental Pollution)

1557

1558

Transcriptome analysis in aggregates of the freshwater fish *Hyphessobrycon*

1559

***luetkenii* inhabiting environments historically contaminated with metal mixtures**

1560

1561

Sandra Isabel Moreno Abril ¹, Janine Altmüller ², Adalto Bianchini ¹, Arne W Nolte ³

1562

1563

1. Universidade Federal do Rio Grande - Brazil, 2. Universität zu Köln –Germany, 3.

1564

Carl von Ossietzky Universität Oldenburg - Germany

1565

1566

* **Corresponding author:** Sandra Isabel Moreno Abril

1567

e-mail: pluieag@gmail.com

1568

Tel: : +55 53 991798228

1569

Permanent address:

1570

Universidade Federal do Rio Grande - FURG

1571

Instituto de Ciências Biológicas

1572

Av. Itália km 8, Campus Carreiros

1573

96.203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

1574

Abstract

1575

Anthropogenic activities release great amounts of residues into the environment, thus

1576

exposing organisms to the toxic effects of associated contaminants. Copper (Cu) mining

1577

in the Minas do Camaquã district (Caçapava do Sul city, southern Brazil) released great

1578

amounts of metal mixtures into the João Dias creek for more than 100 years. Different

1579

aquatic species have been exposed over several generations and can be used as models

1580

to understand how metal contamination can affect genetic and adaptive processes. Here,

1581

we studied differential adaptation in the fish *Hyphessobrycon luetkenii* towards

1582

contaminated (P) and non - contaminated (C) areas.

1583 We aimed to analyze differential gene expression (DGE) induced by metal mixtures in
1584 liver tissue. Groups of *H.luetkenii* inhabiting non – contaminated (CC fish) and
1585 contaminated areas (PP fish) were compared to identify levels of divergence associated
1586 with the natural habitat. Moreover, we separated genetically fixed effects from plastic
1587 gene expression responses by translocating fish from the non-contaminated area to the
1588 contaminated area (CP fish) and vice-versa (PC fish).

1589 Since *H.luetkenii* is not a model species genomic resources had to be developed for this
1590 study. Data on differential gene expression identified larger differences between CC and
1591 PP fish and smaller differences between the translocated fish and their corresponding
1592 controls. This suggests that differences are genetically fixed between both aggregates
1593 with a correspondingly smaller plastic component of gene expression divergence that
1594 can be induced in short term translocation experiments. However, the most
1595 representative findings arose from the analysis of the shared DGE genes between the
1596 CC and PP fish, as well as the CC-CP fish, that were often related with binding activity.
1597 Based on these findings we can infer that *H.luetkenii* survive and inhabit contaminated
1598 areas of the João Dias creek due to their plasticity in the transcriptional regulation.

1599 **Key words:** adaptive, differential gene expression, phenotypic plasticity,
1600 transcriptional regulation

1601

1602 **1. Introduction**

1603 Organisms in stressful environments use an array of adaptive mechanisms to minimize
1604 or handle the imposed stress. In turn, behavioral responses or phenotypic plasticity can
1605 be the first response to a stressing stimulus. Indeed, genetic alterations can be fixed at
1606 the population level (Kavembe et al., 2015). Gene expression alterations due to
1607 exposure to contaminants can serve as an early warning of compromised health. They
1608 can also aid to identify gene interactions (Bozinovic and Oleksiak, 2011).

1609 The freshwater fish *Hyphessobryconluetkenii* species is native of the João Dias creek, a
1610 freshwater ecosystem historically contaminated with metal mixtures associated with Cu
1611 mining activity for more than a century (1870-1996). Indeed, Cu mining in the Minas

1612 do Camaquã district (Caçapava do Sul city, Rio Grande do Sul state, southern Brazil)
1613 released great amounts of Cu, Fe, Mn and other metals in the João Dias creek. The
1614 contamination associated to mining remains strong in some areas of the region (Bidone
1615 et al., 2001) and can vary according to the season, rainfall among other factors. Since
1616 metals play important roles in organisms, they can also become harmful when
1617 concentrations are too high. It is still insufficiently explored, how organisms
1618 accommodate and adapt to increasing levels of metal contaminations.

1619 Enzymes that incorporate single metal atoms or clusters containing metals in their
1620 active sites are classified as metalloenzymes (Finkelstein, 2009). These metals must to
1621 be in their ionic state and consequently can modify the electron flow in a substrate or
1622 enzyme, effectively controlling an enzyme-catalyzed reaction. Metalloenzymes must to
1623 stay in a cellular environment where they can remain stable, properly structured and
1624 have the ability to find and bind the needed metals. Even though, in specific cases the
1625 low levels of the required metal can lead to a metal-replacement process (Valdez et al.,
1626 2014). Without the appropriate metal ion, a biochemical reaction catalyzed by a
1627 particular metalloenzyme would proceed very slowly, if at all (Glusker J. P. et al.,
1628 1999). Therefore, the requirement of some metals is essential for several biological
1629 process, with very low concentrations leading to acclimation and relatively high levels
1630 resulting in toxicity (Santos et al., 2010). These mechanisms are regulated by the gene
1631 expression of associated mRNA and transcription factors as well as changes at the
1632 coding sequence level, which can be potential biomarkers.

1633 Classically, alleles responsible for metal tolerance were studied using allozyme
1634 technique (Gale et al., 2003; Gillespie and Guttman, 1993; Roark and Brown, 1996).
1635 Nowadays the advent of microarrays and sequencing techniques allow us to identify
1636 local adaptation in fish (Larsen et al., 2011; Whitehead et al., 2011). Particularly, RNA
1637 sequencing allows the simultaneous characterization of coding sequence and gene
1638 expression for each transcript in a specific tissue, besides the identification of new
1639 candidate genes for ecotoxicology studies. Additionally, gene ontology (GO) allows the
1640 identification of the main processes that are been altered in the same conditions. As the
1641 divergence of protein sequences, gene expression patterns are fundamental mechanisms
1642 that generate organismal diversity (Warnefors and Kaessmann, 2013). Whereas some
1643 previous studies with transcriptomic analysis have accessed the acute effects of metals,

1644 such as copper, in acclimated species (Santos et al., 2010) or characterized the chronic
1645 effects at a systemic level (Uren et al., 2013), the present study considers the possibility
1646 of adaptive evolutionary changes in natural clusters of fish exposed over several
1647 generations in the wild. Also, it shows the transcriptional mechanisms displayed by the
1648 studied aggregations of fish in order to face rapid changes in the environmental
1649 concentrations of a mixture of metals.

1650 Gene expression analysis was based on sequencing and assembling liver transcriptomes
1651 of *Hyphessobrycon luetkenii* to elucidate the transcriptional mechanisms that determine
1652 ecological success in environments that are chronically contaminated with metal
1653 mixtures. In this study we characterized DGE in livers between groups of *H. luetkenii*
1654 inhabiting non contaminated (CC fish) and contaminated areas (PP fish). In order to
1655 identify if differences were genetically fixed among aggregates or are the product of
1656 phenotypic plasticity, a common garden experiment was done. Fish were translocated
1657 from the non-contaminated area to the contaminated area (CP fish) and vice-versa (PC
1658 fish). Afterwards, the results of translocation were compared against the results of the
1659 original groups (CC and PP fish) in order to verify the mechanisms in common among
1660 them.

1661 **2. Materials and Methods**

1662

1663 *Ethics and legal statements*

1664 All procedures performed in the present study were approved by the University
1665 Committee for Ethics in Animal Use (CEUA; protocol #23116.001365/2015-44) and
1666 the Brazilian Ministry of Environment (MMA, license #44769-1).

1667 *Environmental parameters and metal analyses*

1668 The experimental procedures of the present study were performed in two places of the
1669 João Dias creek (Control - C and Polluted - P sites). Environmental parameters (water
1670 temperature, pH, and dissolved O₂ content) were monitored once a day during fish
1671 collection and the translocation experiment (Table 1). Every day, non filtered and
1672 filtered (0.45- μ m mesh filter) water samples were collected, acidified with 65% nitric
1673 acid (HNO₃, 1% final concentration) and stored at 4°C until analysis of total and
1674 dissolved waterborne metal concentrations, respectively (Table 2).

1675 All reagents used in the present study were of high-purity grade. Water used for
1676 preparing all reagents and reference solutions was deionized and further purified by a
1677 Milli-Q system (Millipore Corp., Bedford, USA). Water samples were acidified with
1678 65% HNO₃ (Suprapur[®], Merck, Darmstadt, Germany). Reference standard solutions of
1679 metals were prepared by serial dilution of 1000 mg/L stock solutions (Multi-Element
1680 Standards Certipur[®], Merck, Darmstadt, Germany).

1681 Dissolved metal concentrations were determined by High-Resolution Continuum
1682 Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (HR-CS GF AAS, model
1683 Control-A 700, Analytic Jena, Germany) equipped with AGS-GF and a transversely
1684 heated graphite tube atomizer. Pyrolytic graphite tubes with platforms were used. A Xe
1685 short-arc lamp (GLE, Berlin, Germany) in “hot-spot” mode was used as radiation
1686 source.

1687 *Translocation experiment*

1688 One hundred male and female fish (mean total body length = 4.11 cm) were collected in
1689 the C site (Figure 1.a) and kept caged at this site (CC fish) or translocated and kept
1690 caged at the P site (CP) for 96 h. In turn, ninety fish (mean total body length = 4.32 cm)
1691 were collected in the P site (Figure 1.b) and kept caged at this site (PP fish) or
1692 translocated and kept caged at the C site (PC fish) for 96 h. Cages were built with PVC
1693 pipe structure and mesh (5,000 cm³). Fish were stocked at a density <0.1 g fish/L. After
1694 96 h of experiment, fish were anesthetized with benzocaine, decapitated, and the liver
1695 was extracted. The liver samples were immediately placed in RNA-later (Ambion)
1696 following the manufacturer’s instructions.

1697 *RNA extraction*

1698 Total mRNA from the livers of six fish of each experimental group was extracted with
1699 Trizol (Ambion, USA) and reversely transcribed using the High Capacity cDNA
1700 Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA) and RNase inhibitor (Applied
1701 Biosystems, North America). The livers of the other organisms were destined to
1702 biochemical analyses that are not part of this study. The quality of the extracted RNA
1703 was checked on Agarose gels (1%), using the RNA ScreenTape[®] and the TapeStation
1704 Analysis Software A.01.05 (SR1)[®] (Agilent Technologies, 2014). All RNA samples
1705 used in the present study had RNA Integrity Number (RIN) scores > 6.6.

1706 *Transcriptomic analysis*

1707 In order to screen the transcriptome of the four experimental groups (CC, CP, PP and
1708 PC fish), twenty-four individuals were chosen (six for every experimental group).
1709 Libraries for RNA-seq were prepared from total RNA at the Cologne Centre for
1710 Genomics (University of Cologne, Germany). Paired end (PE) sequencing (100 bp read
1711 length from each end) was performed on an Illumina HiSeq4000 system (Illumina, San
1712 Diego, CA, USA) which resulted in approximately 250-300 Gb of data. Raw paired end
1713 reads were quality trimmed and assembled into a transcriptome using Trinity
1714 (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>). The resulting contigs were mapped
1715 against all annotated cDNAs of *A. mexicanus* ([ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-
1716 90/fasta/astyanax_mexicanus/](ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-90/fasta/astyanax_mexicanus/)), sorted and had their expression levels quantified with
1717 "samtools". In order to estimate differential gene expression levels (DGE) for every
1718 sequence and get visual representations of the samples distribution and DGE, was used
1719 with the R version 3.3.1 (2016-06-21) and the packages edgeR (Chen et al., 2017)
1720 version 3.14.0, *limma* version 3.28.21, *Biobase* version 2.32.0, *maSigPro* version 1.44.0
1721 gplots version 3.0.1. The Gene Ontology (GO) terms for the Up and Down regulated
1722 genes were categorized with the use of the gProfiler g:GOST Gene Group Functional
1723 Profiling online tool (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/index.cgi>). The corresponding GO IDs
1724 were visualized using the REVIGO online tool [<http://revigo.irb.hr/> (Supek et al., 2011)]
1725 and the free version of Blast2GO 4.1 software.

1726 The identification of genes from *H.luetkenii* through blast searches that identified *A.*
1727 *mexicanus* homologous was straightforward (<http://www.ensembl.org/index.html>).
1728 Gene functions were inferred based on the the NCBI-Gene database
1729 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

1730

1731 **3. Results**

1732

1733 The *denovo* transcriptome assembly based on RNAseq data from the 24 liver samples
1734 allowed the identification of 34,471 sequences that had a significant match with a
1735 known transcript of *A. mexicanus*. Direct mapping of raw reads against the *A.*
1736 *mexicanus* transcriptome allowed the identification of 21,227 sequences with their
1737 corresponding DGE and GO terms. The distribution of DGE among samples in a MDS
1738 graph (Figure. 2.) showed that the analyzed samples are grouped in three main clusters:

1739 CC, CP-PC and PP fish. In order to evaluate the differential gene expression among the
1740 experimental groups and their corresponding GO terms, fish originating from each site
1741 (CC and PP fish) were compared with the corresponding translocated ones (CP and PC
1742 fish, respectively). In CP fish, 45 genes were induced and 102 genes were inhibited
1743 relative to CC fish (Figure 3.a., Appendix 1). In turn, fish translocation from the
1744 contaminated site to the non-contaminated site (PC) induced 210 genes and inhibited of
1745 351 genes (Figure 3.b., Appendix 2). When comparing fish collected and kept caged in
1746 the non contaminated site and collected and kept caged in the contaminated site
1747 respectively, conspicuous DGE was observed: 521 genes were up-regulated and 549
1748 genes were down-regulated in PP fish (Figure 3.c., Appendix 3). Additionally, the
1749 relationship between the two fish communities was verified by comparing the DGE
1750 results between CC and CP fish, as well as CC and PP fish. This allowed us to identify
1751 21 genes that were induced in CP fish or present in higher levels in PP fish and 44 genes
1752 that were inhibited in CP fish or showing lower expression levels in PP (Appendix 4).

1753

1754 The metalloenzymes appears like a constant term highly representative in the tag clouds
1755 for all the experimental conditions tested, except in the group of the genes induced in
1756 the CC- CP comparison (Appendices 1, 2, 3 and 4). Though “metalloenzyme” is not a
1757 GO term, its frequency in the results must be considered, even more taking account the
1758 metabolic implications of this kind of molecules and their direct dependence of metal
1759 availability. Results corresponding to the enrichment analysis allowed the identification
1760 of several processes for each experimental group. However, it would be difficult to
1761 classify them into a reduced group of processes due to the ubiquitous role showed by
1762 metalloenzymes.

1763

1764 **Discussion**

1765

1766 The results of DGE distribution show that the *H.luetkenii* aggregates from non-
1767 contaminated and contaminated areas (CC and PP fish) display different patterns of
1768 gene expression (Figure 2. and 3.c., Appendix 3). This finding was complemented with
1769 results from our translocation experiment, in which DGE of transplanted fish could be
1770 evaluated against non - translocated fish (CC-CP against CC-PP DGE results). The lists
1771 of differentially expressed genes overlap, with a high proportion of common genes that
1772 are UP regulated (21 genes, 46.6%) and DOWN regulated (44 genes, 43.1%) in CP fish

1773 (Appendix 4). These results suggest that regulatory processes at transcriptional level
1774 that are being modulated in order to accommodate to the new environment. We suspect
1775 that metal contamination could be the critical factor in our experiment, as it is known to
1776 vary between the concerned habitats, and because the analysis of the functions of genes
1777 that change expression patterns revealed frequent metalloenzymes, which we will
1778 discuss below.

1779

1780 *DGE associated with the ecological success of H. luetkenii in contaminated*
1781 *environments (common DEG between CC and CP fish and CC and PP fish)*

1782 The first section of the following discussion will focus on the common results of DEGs
1783 between the CC and CP fish and CC and PP fish. The enrichment analysis of the up
1784 regulated genes in common (CC-CP / CC-PP) allowed us to identify the binding process
1785 as the molecular process more widely represented (GO:0005488). This is characterized
1786 by the binding activity of several types of molecules such as ions, proteins, nucleic
1787 acids, among others. Of particular concern for this study is the metal ion binding
1788 process, exemplified by the matrix metalloproteinase-16-like
1789 (ENSAMXG00000000095) and the nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2 a
1790 (ENSAMXG000000017580) gene which also can be implicated in process as the steroid
1791 hormone response and the response to other lipid substances. It is important to highlight
1792 that both genes afore named use Zn as cofactor and that the term “zinc dependent
1793 substances” is a frequent keyword in the GO terms of this group. Additionally, other
1794 process highly represented in this group is the steroid metabolic process (GO:0008202)
1795 characterized by the genes of: (1) the CYP7A1 (ENSAMXG000000009436) protein that
1796 catalyzes the first reaction for the cholesterol catabolic pathway in the liver; (2) the
1797 phospholipase A2 (ENSAMXG000000019834), which catalyzes the hydrolysis of the sn-
1798 2 fatty acid acyl ester bond of phosphoglycerides, releasing free fatty acids and
1799 lysophospholipids, and also participates in the regulation of the phospholipid
1800 metabolism in biomembranes; and (3) the hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3
1801 beta- and steroid delta-isomerase (ENSAMXG000000009436), which catalyzes the
1802 oxidative conversion of delta(5)-ene-3-beta-hydroxy steroid, the oxidative conversion of
1803 ketosteroids, and plays a crucial role in the biosynthesis of all classes of hormonal
1804 steroids.

1805 On the other hand, the enrichment analysis of the down regulated genes in common
1806 between the CC and CP fish and CC and PP fish, surprisingly allowed us to identify the
1807 ion binding function (GO:0043167) as the most representative molecular function in
1808 this case. It is characterized by the gene of the nuclear receptor subfamily 1, group d,
1809 member 1 (ENSAMXG00000015855), the Ependymin-like 2
1810 (ENSAMXG00000020238) and other sequences associated to the metal ion binding
1811 function, no named until now (ENSAMXG00000018483, ENSAMXG00000020478).
1812 The lipid binding function also appears among the down regulated process, represented
1813 by the nuclear receptor subfamily 1, group d, member 1 (previously cited) and the
1814 apolipoprotein A-IV (ENSAMXG00000009607). Due the central role of this protein for
1815 the lipid availability (Dominiczak and Caslake, 2011) and the induction of diverse genes
1816 implicated in the transformation of lipidic and steroid substances (explained above), we
1817 verified that lipidic metabolism is one of the most affected process in both short and
1818 chronic exposures to metal mixtures. Acute experiments have shown that genes
1819 associated with the cholesterol biosynthesis and metabolism were down-regulated in
1820 liver of stickleback *Gasterosteus aculeatus* exposed to Cu (Santos *et al.*, 2010). Also, it
1821 has been shown that chronic effects of metals can affect fish growth by alterations in the
1822 carbohydrate and lipidic metabolism (Levesque *et al.*, 2002). Therefore, our results
1823 suggest that regulatory mechanisms at transcriptional level in *H.luetkenii* can be rapidly
1824 regulated (CC and CP fish). Additionally, they indicate that this regulation can remain
1825 over the time (CC and PP fish) in order to guarantee the establishment and ecological
1826 success of *H.luetkenii* in environments chronically contaminated with metal mixtures.

1827

1828 *DGE associated with the fish translocation experiment (DEG in PP and PC fish and*
1829 *common genes expressed in CP and PC fish)*

1830 Results of the PP and PC translocation experiment suggest an induction of the
1831 cytochrome c oxidase subunit 7A-related gene (ENSAMXG00000015985), which can
1832 be implicated in the trans-membrane transport of ions (GO:0006811), including
1833 inorganic cations, but that also can be implied in the heme-copper terminal oxidase
1834 activity. Additionally, they show the induction of the ATPase, class I, type 8B, member
1835 4 (ENSAMXG00000000590), the NIN1/RPN12 binding protein 1
1836 (ENSAMXG00000003642), Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
1837 (ENSAMXG00000006152) previously named, the ring finger and CCCH-type (with Zn

1838 finger domains), among other genes, that give origin to proteins with cation binding
1839 activity.

1840 The PP-PC translocation generated the down regulation of the cation transmembrane
1841 transporter activity (GO:0008324), here represented by several sequences as the solute
1842 carrier family 9 member A8 (ENSAMXG00000000696), the cholinergic receptor,
1843 nicotinic, alpha 2a (ENSAMXG00000000805), solute carrier family 39 (zinc
1844 transporter), member 13 (ENSAMXG000000006000), Sodium channel, voltage-gated,
1845 type I, beta b (ENSAMXG00000020557), among others proteins that can alter the ionic
1846 balance. Alterations in the ionic equilibrium has been previously related as chronic
1847 effects of metals in fish (Uren et al., 2013).

1848 Additionally, comparing both translocated groups, we could identify some genes
1849 directly related with the translocation and that could interfere in the interpretation of our
1850 results. The up regulated genes are the Fatty acid binding protein 2
1851 (ENSAMXG00000006844) protein that binds saturated long-chain fatty acids with high
1852 affinity, and may act as a lipid sensor to maintain energy homeostasis, and more two
1853 novel sequences with unknown identity and function ENSAMXG00000028935 and
1854 ENSAMXG00000028982. On the other hand, the down regulated genes include the
1855 ubiquitin specific peptidase 18 (ENSAMXG00000000606), a sequence that appears as
1856 the most representative molecular function down regulated in the PP-PC group and the
1857 Transglutaminase 2, like (ENSAMXG00000003354) protein involved in apoptotic
1858 process.

1859 *Other DEG between fish aggregates (CC and PP fish)*

1860 As discussed earlier, part of the genes differentially expressed showed similar responses
1861 to those observed in CP fish. However, the representativeness of these genes in PP fish
1862 is very low, being only 4.03% of the over expressed genes and 8.01% of the lower
1863 expressed genes at basal level. Some of those differences could be due to environmental
1864 factors, non-directly related to the contamination. For example as showed in the Table
1865 1, existed significant differences in temperature during the experiment and process
1866 response to temperature stimulus (GO:0009266) was down regulated in the PP group,
1867 fact that may directly related with the incidence of light in the contaminated area
1868 (Figure. 1) and can influence other process as the detection of light stimulus
1869 (GO:0009583), detection of visible light (GO:0009584) and response to decreased
1870 oxygen levels (GO:0036293), all of them up regulated in the PP group (Appendix 3).

1871 Considering that wild fish populations are subject to several stimulus and not just to the
1872 desired experimental conditions, and because the high sensitivity of the RNAseq
1873 technique, it is important to emphasize the need for developing a careful experimental
1874 design, a careful data processing with a good normalization process, and a good GO
1875 analysis (Han et al., 2015), which in the case of the present study provided us a
1876 functional information according to the main goal of our study.

1877

1878 *Concluding remarks*

1879 The translocation experiments performed in the present study allowed us to identify
1880 several regulatory responses in both fish aggregates. Contrary to our expectation,
1881 responses were not predominantly related to the metal detoxification or metabolism
1882 processes. However, many of the genes that showed changes in their expressions are
1883 structurally or regulatory dependent on metals (metalloenzymes). Because of this, we
1884 can assume that aggregates of *H.luetkenii* inhabiting the site historically contaminated
1885 with metal mixtures in the João Dias creek are highly adapted to face environmental
1886 changes in metal concentrations. However, it would be important to evaluate the
1887 responses associated with metal detoxification and metabolism processes over shorter
1888 periods of time in order to check if those responses would not be occurring faster.
1889 Finally, it is worth noting that results in common between the CC-CP and CC-PP fish
1890 allowed us to identify several genes associated to transport, steroid metabolism and ion
1891 binding that can be rapidly regulated by *H.luetkenii*, thus bringing evidence on how this
1892 type of contamination can affect non adapted fish.

1893

1894 **Acknowledgements**

1895 The present study was supported by an ERC starting Grant (“Evolmapping”) to A.N;
1896 grants of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq,
1897 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática, Brasília, DF,
1898 Brazil. grant # 573949/2008-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino
1899 Superior (CAPES, Brasília, DF, Brazil, grant # 230/2010), International Development
1900 Research Centre (IDRC, Ottawa, ON, Canada, grant # 104519-027), and Deutscher
1901 Akademischer Austauschdienst (DAAD, Bonn, Germany). Thanks to the Laboratory of
1902 Ökologische Genomics of the Carl von Ossietzky Universität Oldenburg. Special thanks
1903 to MSc Ela Iwaszkiewicz, PhD Patrícia Gomes Costa, PhD Mariana Machado Lauer,

1904 MSc Vinícius Dias Borges and BSc Gilson Junior Cordeiro for their help during the
1905 development of the present study.

1906

1907 **Conflict of interest**

1908 Authors declare no *conflict of interest*.

1909

References

1910

- 1911 Bidone, E.D., Laybauer, L., Castilhos, Z.C., Maddock, J.L., 2001. Environmental risk
1912 increase due to heavy metal contamination caused by a copper mining activity in
1913 Southern Brazil. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 73, 277–286.
1914 <https://doi.org/10.1590/S0001-37652001000200011>
- 1915 Bozinovic, G., Oleksiak, M.F., 2011. Genomic approaches with natural fish populations
1916 from polluted environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 283–289.
1917 <https://doi.org/10.1002/etc.403>
- 1918 Chen, Y., McCarthy D., Ritchie M., Robinson M., Smyth G. K., 2017. edgeR:
1919 differential expression analysis of digital gene expression data - User's Guide.
1920 DOI: 10.18129/B9.bioc.edgeR
- 1921 Dominiczak, M.H., Caslake, M.J., 2011. Apolipoproteins: metabolic role and clinical
1922 biochemistry applications. *Ann. Clin. Biochem.* 48, 498–515.
1923 <https://doi.org/10.1258/acb.2011.011111>
- 1924 Finkelstein, J., 2009. Metalloproteins. *Nature* 460, 813–813.
1925 <https://doi.org/10.1038/460813a>
- 1926 Gale, S.A., Smith, S.V., Lim, R.P., Jeffree, R.A., Petocz, P., 2003. Insights into the
1927 mechanisms of copper tolerance of a population of black-banded rainbowfish
1928 (*Melanotaenia nigrans*) (Richardson) exposed to mine leachate, using 64/67Cu.
1929 *Aquat. Toxicol.* 62, 135–153. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00081-4)
- 1930 Gillespie, R.B., Guttman, S.I., 1993. Correlations between water quality and frequencies
1931 of allozyme genotypes in spotfin shiner (*Notropis spilopterus*) populations.
1932 *Environ. Pollut.* 81, 147–150. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(93\)90079-4](https://doi.org/10.1016/0269-7491(93)90079-4)
- 1933 Glusker J. P., Katz A. K., Bock C. W., 1999. Metal ions in biological systems. *Rigaku J.*
1934 16, 8–17.
- 1935 Kavembe, G.D., Franchini, P., Irisarri, I., Machado-Schiaffino, G., Meyer, A., 2015.
1936 Genomics of Adaptation to Multiple Concurrent Stresses: Insights from
1937 Comparative Transcriptomics of a Cichlid Fish from One of Earth's Most
1938 Extreme Environments, the Hypersaline Soda Lake Magadi in Kenya, East
1939 Africa. *J. Mol. Evol.* 81, 90–109. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9696-6>
- 1940 Larsen, P.F., Schulte, P.M., Nielsen, E.E., 2011. Gene expression analysis for the
1941 identification of selection and local adaptation in fishes. *J. Fish Biol.* 78, 1–22.
1942 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02834.x>
- 1943 Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2002. Seasonal variation
1944 in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*)
1945 chronically exposed to metals in the field. *Aquat. Toxicol.* 60, 257–267.
1946 [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00012-7)

1947 Roark, S., Brown, K., 1996. Effects of metal contamination from mine tailings on
1948 allozyme distributions of populations of great plains fishes. *Environ. Toxicol.*
1949 *Chem.* 15, 921–927. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150614>
1950 Santos, E.M., Ball, J.S., Williams, T.D., Wu, H., Ortega, F., van Aerle, R., Katsiadaki,
1951 I., Falciani, F., Viant, M.R., Chipman, J.K., Tyler, C.R., 2010. Identifying
1952 Health Impacts of Exposure to Copper Using Transcriptomics and
1953 Metabolomics in a Fish Model. *Environ. Sci. Technol.* 44, 820–826.
1954 <https://doi.org/10.1021/es902558k>
1955 Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., Šmuc, T., 2011. REVIGO Summarizes and
1956 Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLOS ONE* 6, e21800.
1957 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800>
1958 Uren W., T.M., Bury, N., van Aerle, R., Santos, E.M., 2013. Global Transcriptome
1959 Profiling Reveals Molecular Mechanisms of Metal Tolerance in a Chronically
1960 Exposed Wild Population of Brown Trout. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8869–
1961 8877. <https://doi.org/10.1021/es401380p>
1962 Valdez, C.E., Smith, Q.A., Nechay, M.R., Alexandrova, A.N., 2014. Mysteries of
1963 Metals in Metalloenzymes. *Acc. Chem. Res.* 47, 3110–3117.
1964 <https://doi.org/10.1021/ar500227u>
1965 Warnefors, M., Kaessmann, H., 2013. Evolution of the Correlation between Expression
1966 Divergence and Protein Divergence in Mammals. *Genome Biol. Evol.* 5, 1324–
1967 1335. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt093>
1968 Whitehead, A., Galvez, F., Zhang, S., Williams, L.M., Oleksiak, M.F., 2011. Functional
1969 Genomics of Physiological Plasticity and Local Adaptation in Killifish. *J. Hered.*
1970 102, 499–511. <https://doi.org/10.1093/jhered/esq077>
1971

1972

1973

1974

1975 **Tables**

1976

1977 **Table 1. Environmental Parameters.** Physicochemical parameters of water samples of
1978 the non contaminated and the contaminated site of the João Dias creek (Caçapava do
1979 Sul city, Rio Grande do Sul state, southern Brazil). DO: dissolved oxygen content. *
1980 indicates significant different mean value between sampling sites (n = 10; Student *t* test;
1981 P<0.05).

1982

Parameter	Control	Polluted
Temperature (°C)	24.6 ± 0.39	26.8 ± 0.37*
pH	5.08 ± 0.06	5.02 ± 0.02
DO (mg O ₂ /L)	7.07 ± 0.10	6.95 ± 0.11

1983

1984

1985

1986 **Table 2. Waterborne metal concentrations.** Mean values (\pm SE) of metal
 1987 concentrations in water samples of the non contaminated (C site) and the contaminated
 1988 (P site) of the João Dias creek (Caçapava do Sul city, Rio Grande do Sul state, southern
 1989 Brazil). Different letters indicate significant different mean values among conditions
 1990 (ANOVA followed by Tukey test; $P < 0.05$).

1991

Parameter	Non contaminated site		Contaminated site	
	Total	Dissolved	Total	Dissolved
Cd ($\mu\text{g/L}$)	6.43 ± 0.24^a	4.27 ± 0.30^b	5.58 ± 0.41^a	3.13 ± 0.30^b
Cu ($\mu\text{g/L}$)	2.94 ± 0.95^{ab}	1.21 ± 0.71^a	10.18 ± 1.48^c	4.10 ± 0.52^b
Fe (mg/L)	1.83 ± 0.44^a	0.53 ± 0.10^b	2.61 ± 1.98^a	0.53 ± 0.12^b
Mn ($\mu\text{g/L}$)	25.17 ± 2.42^a	18.11 ± 2.87^a	32.73 ± 4.13^a	27.29 ± 4.04^a
Pb ($\mu\text{g/L}$)	19.55 ± 2.06^a	9.21 ± 2.58^b	17.34 ± 2.75^a	11.54 ± 1.59^{ab}
Zn ($\mu\text{g/L}$)	1.73 ± 0.40^{ab}	0.71 ± 0.23^a	2.57 ± 0.59^b	1.03 ± 0.35^{ab}

1992

1993

1994 **Figure captions**

1995 **Figure 1. Locations of collect and translocation.** a. Non contaminated site (C), b.
1996 Contaminated site (P).

1997 **Figure 2. Samples distribution.** Exploratory MDS graph showing the sample relations
1998 based on multidimensional scaling. EdgeR, plotMDS(d, method="logFC").

1999 **Figure 3. Differential Gene Expression (DGE).** Total number of genes significantly
2000 up-regulated or down-regulated (red), estimated by the paired test between: a. CC and
2001 CP fish; b. PP and PC fish; c. CC and PP fish (EdgeR decide testDGE, $p = 0.05$).

2002

2003 **Figure 1.**



2004

2005

2006

2007

2008

2009

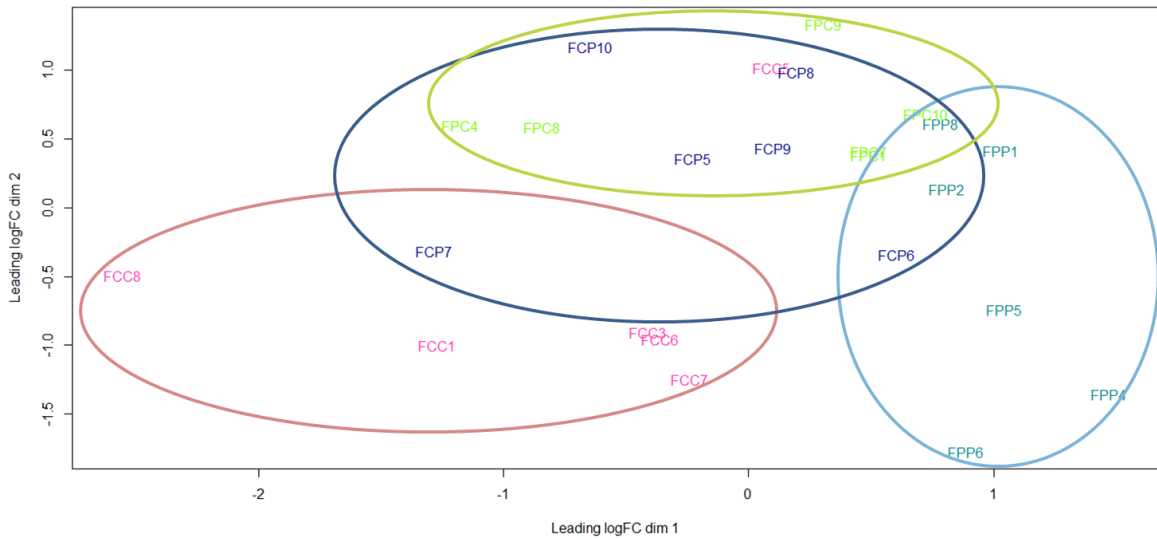
2010

2011

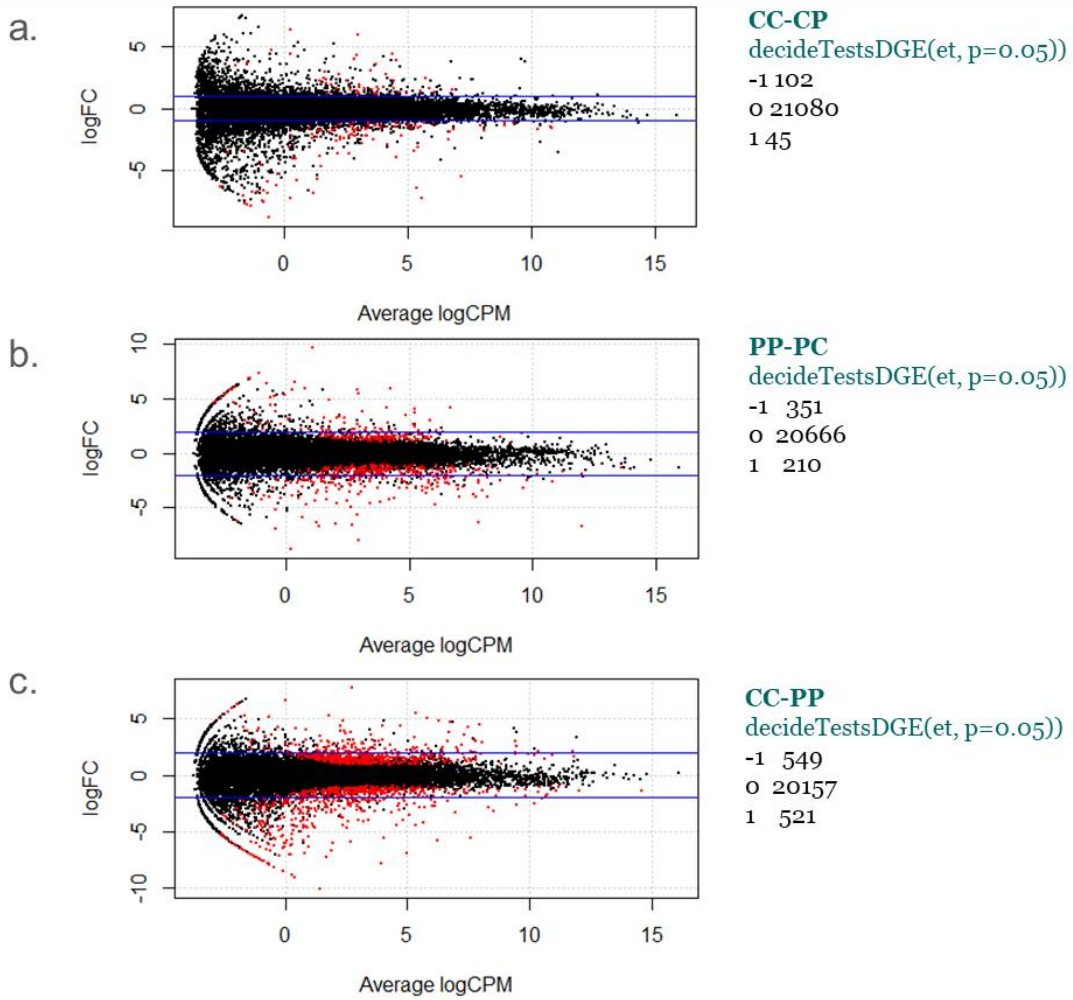
2012

2013

2014 **Figure 2.**

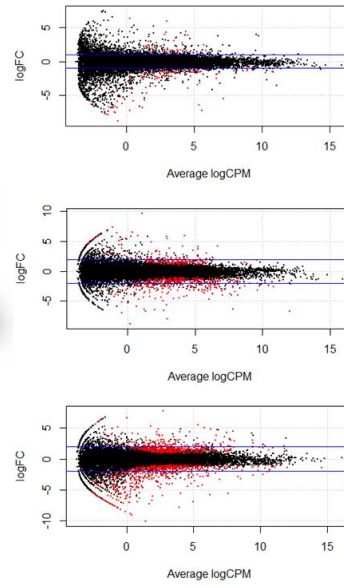
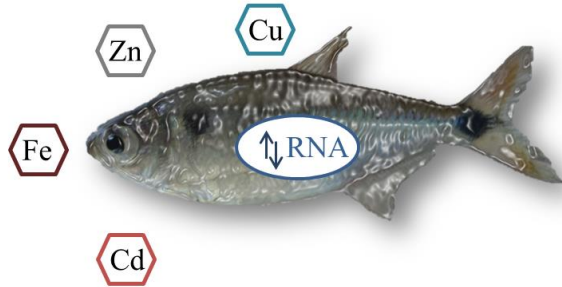


2015
2016 **Figure 3.**



2017

2018 **Graphical abstract**



2019

2020

2021

2022

2023

2024

2025

2026

2027

2028

2029

2030

2031

2032

2033

2034

Discussão Geral

2035

2036 Classicamente, os estudos de toxicologia de metais se basearam em exposições de
2037 organismos a um metal de forma isolada, o que dificilmente acontece na natureza.
2038 Portanto, alguns autores já haviam mencionado a necessidade de serem realizados
2039 estudos que poderiam avaliar os efeitos fisiológicos de misturas de metais, visando uma
2040 abordagem mais realística, devido aos possíveis efeitos interativos dos metais em
2041 ambientes aquáticos (Craig et al., 2009).

2042 A contaminação por metais é um fenômeno tão antigo que atualmente encontramos
2043 cenários naturais com uma grande diversidade de organismos que têm sofrido os efeitos
2044 da contaminação por muitas gerações. Este é o caso do lambari *Hyphessobrycon*
2045 *luetkenii* que habita o arroio João Dias na região das Minas do Camaquã (Caçapava do
2046 Sul, RS). Portanto, com o objetivo de compreender quais processos em nível
2047 transcricional permitem o sucesso ecológico desta espécie em ambientes contaminados
2048 por mistura de metais, na discussão dos achados obtidos no presente estudo serão
2049 explorados apenas os resultados mais significativos que se encontram descritos nos três
2050 manuscritos que compõem a presente Tese.

2051 A classificação dos organismos estudados foi realizada a partir de chaves taxonômicas,
2052 baseadas nos caracteres externos do organismo (Dalton et al., 2000; Weiss, 2013).

2053 Com relação aos sequenciamentos, a proximidade filogenética entre *H. luetkenii* e *A.*
2054 *mexicanus* foi evidente, devido à alta identidade tanto das sequências individuais quanto
2055 do transcriptoma total, o que permitiu identificar e caracterizar aproximadamente dois
2056 terços das sequências do transcriptoma de *H. luetkenii*.

2057 Devido ao fato de que as respostas em nível de expressão foram evidenciadas na
2058 maioria dos tecidos estudados, e com a finalidade de ter um panorama mais claro das
2059 respostas específicas destes tecidos, a discussão a seguir será apresentada a partir dos
2060 resultados obtidos para cada tecido analisado.

2061

2062 Brânquias:

2063 As brânquias são a principal rota de incorporação de metais em peixes de água doce,
2064 devido à sua grande superfície de contato com o ambiente (Hansen et al., 2007). De

2065 fato, as brânquias possuem um papel preponderante tanto para a incorporação (Grosell
2066 and Wood, 2002) quanto para o acúmulo de Cu (Eyckmans et al., 2012) e outros metais
2067 em peixes. Portanto, são um alvo interessante de estudo e avaliação temporal destes
2068 processos em espécies habitantes de ambientes com níveis variáveis de metais.

2069 Nos manuscritos 1 e 2 é demonstrado como a expressão do gene que codifica para as
2070 metalotioneínas é altamente responsiva não só aos experimentos de translocação, mas
2071 também quando se comparam os níveis basais entre os dois agrupamentos estudados
2072 (manuscrito 2). Nos organismos originários do ponto contaminado (PP), foi possível
2073 caracterizar melhor estas respostas, já que estes apresentaram uma inibição do gene que
2074 expressa as metalotioneínas apenas 24 h após a translocação dos peixes para o local não
2075 contaminado. Outra informação importante aportada por estes resultados evidencia que
2076 os indivíduos do agrupamento coletado no local não contaminado apresentam baixos
2077 níveis basais de expressão deste gene, níveis estes que são muito similares com a
2078 inibição apresentada pelos peixes do local contaminado após 96 h de translocação para
2079 o local não contaminado (PC). Estes resultados se devem claramente à importância das
2080 metalotioneínas na proteção contra níveis excessivos de metais no organismo, a qual foi
2081 uma resposta às concentrações mais elevadas de metais no local contaminado,
2082 principalmente de Cu. Igualmente, em populações de *Salmo trutta* expostas
2083 cronicamente a misturas de metais, havia sido observado que altos níveis de expressão
2084 de metalotioneínas, tanto em brânquias como em outros tecidos, podem ser
2085 consideradas como evidência de um mecanismo de tolerância a este tipo de
2086 contaminação (Uren et al., 2013). Por outro lado, não foram observadas diferenças
2087 significativas na expressão do gene que codifica para as metalotioneínas após 96 h de
2088 translocação dos peixes do local não contaminado para o local contaminado (CP). Esta
2089 ausência de resposta pode ser interpretada de várias maneiras, sendo que a mais simples
2090 delas seria aquela proposta por Hansen et al. (2007), que postulam que um mecanismo
2091 de proteção frente à contaminação por metais seria a produção de muco na brânquia.
2092 Porém, devido às rápidas respostas que estes peixes podem apresentar, as quais estão
2093 demonstradas no terceiro manuscrito desta Tese, não se pode descartar a possibilidade
2094 de que alguma mudança na expressão tenha ocorrido numa janela temporal que não
2095 coberta durante os experimentos, como por exemplo, em menos de 24 h.

2096 Embora não tenham sido identificadas mudanças significativas associadas à
2097 translocação para nenhum dos dois genes que codificam os transportadores, diversos

2098 estudos têm evidenciado a responsividade destes genes em peixes frente à mudanças nos
2099 níveis de Cu ambiental, sendo que os dois genes seriam induzidos em baixas
2100 concentrações (Craig et al., 2009; Leung et al., 2014) e inibidos em concentrações mais
2101 elevadas (20 µg/L) (da Silva et al., 2014).

2102 Além disso, os resultados de acumulação nas brânquias evidenciaram uma rápida
2103 capacidade de resposta (excreção) dos indivíduos testados para todos os metais
2104 analisados, uma vez que os níveis de acumulação de todos os metais analisados foram
2105 significativamente menores nos organismos translocados do local contaminado para o
2106 local não contaminado. Embora os níveis de expressão do ATP7A que seria o principal
2107 responsável da excreção de Cu não tenha evidenciado mudanças, outros genes
2108 envolvidos neste processo poderão ser abordados em estudos futuros.

2109

2110 Fígado

2111 O fígado é o principal órgão envolvido nos processos de detoxificação não só de metais,
2112 mas também de xenobióticos em geral. No fígado, além das diferenças pontuais de
2113 expressão para os quatro genes alvo do presente estudo (manuscrito 2), são apresentados
2114 os resultados da análise do transcriptoma, os quais permitem uma visualização mais
2115 global da natureza dos processos envolvidos no estabelecimento de *H.luetkenii* na área
2116 de estudo, desde uma perspectiva adaptativa e toxicológica (manuscrito 3).

2117 Os resultados comparativos obtidos em nível de expressão relativa evidenciam que a
2118 expressão basal do fator de transcrição MTF-1, o principal fator de transcrição
2119 implicado no metabolismo de diversos metais de transição, como o Cu (Balamurugan e
2120 Schaffner, 2006) e o Zn (Andrews, 2001), é bastante diferente entre os dois
2121 agrupamentos de *H.luetkenii* estudados, sendo mais elevada no grupo coletado e
2122 mantido no local não contaminado (CC) do que naquele coletado e mantido na região
2123 contaminada (PP). As diferenças nos níveis basais de expressão deste gene podem estar
2124 relacionadas à necessidade de regulação de um amplo número de genes implicados no
2125 metabolismo de metais (Günther et al., 2012), os quais são requeridos pelo organismo
2126 para habitar ambientes com rápidas mudanças na concentração de metais. Cabe ressaltar
2127 que os estudos relacionados com este fator de transcrição têm focado a sua atividade e
2128 capacidade regulatória. Porém, os efeitos do estresse gerados pela exposição de peixes a

2129 metais sobre este fator de transcrição ainda não haviam sido abordados antes da
2130 realização do presente estudo.

2131 Já para o gene que codifica as MT, os resultados do experimento de translocação (CC-
2132 CP) realizado no presente estudo evidenciaram que, assim como foi observado para
2133 outras espécies de água doce (Craig et al., 2009; Lam et al., 1998), existe uma
2134 correlação positiva entre os níveis ambientais de Cu e a expressão deste gene no fígado,
2135 sendo a indução desse gene e a provável consequente síntese de proteínas, um
2136 mecanismo de proteção apresentado pelas células hepáticas frente aos altos níveis
2137 ambientais deste metal.

2138 Embora alguns estudos tenham demonstrado que a expressão do gene que codifica a
2139 ATP7A no fígado de peixes também seja induzível por exposições agudas ao Cu (Leung
2140 et al., 2014; Craig et al., 2009), nenhuma mudança significativa na expressão desse gene
2141 foi evidenciada após exposição a qualquer uma das condições experimentais testadas no
2142 presente estudo.

2143 Por outro lado, a expressão do gene que codifica para o CTR1 foi inibida nos peixes
2144 coletados no local não contaminado e translocados para o local contaminado (CP). Esta
2145 resposta deve estar relacionada ao papel fundamental deste transportador na
2146 incorporação de Cu no hepatócito (Wijmenga e Klomp, 2004). Portanto, esta resposta
2147 estaria alinhada à indução das MT observada neste grupo de peixes, caracterizando
2148 assim a ativação de diversos mecanismos de proteção por parte das células hepáticas.
2149 Neste caso específico, com a finalidade de reduzir a incorporação de Cu e assim evitar
2150 quantidades excessivas deste metal na célula.

2151

2152 **Análise de transcriptoma**

2153 Como apresentado na Introdução Geral desta Tese, são muitas as informações tanto
2154 estruturais como em nível de processos e regulação que podem ser obtidas a partir da
2155 análise de transcriptoma. Atualmente, é amplamente aceito que, além das divergências
2156 nas sequências proteicas, os padrões de expressão gênica também podem ser um
2157 mecanismo fundamental para gerar diversidade (Warnefors e Kaessmann, 2013). Isto é
2158 de grande interesse em indivíduos que habitam ambientes estressantes, nas quais são
2159 ativados diversos mecanismos adaptativos para responder aos estímulos estressantes,
2160 sendo que estas respostas podem se fixar ao longo do tempo em nível de população

2161 (Kavembe et al., 2015). Portanto, as novas técnicas de sequenciamento permitem
2162 acessar tanto mudanças na expressão gênica devidas à exposição a contaminantes que
2163 possam comprometer a saúde dos organismos silvestres, quanto identificar as diversas
2164 interações que estão ocorrendo em nível genético (Bozinovic e Oleksiak, 2011).

2165 Enquanto alguns estudos anteriores têm acessado os efeitos agudos do Cu em espécies
2166 aclimatadas (Santos et al., 2010) ou têm caracterizado os efeitos crônicos dos metais em
2167 nível sistêmico (Uren et al., 2013), o presente estudo caracterizou os padrões de
2168 expressão basal de genes em organismos habitantes de ambientes com diversos níveis
2169 de contaminação por mistura de metais e que têm sido historicamente expostos a
2170 contaminação por esta mistura de metais, bem como avaliou as respostas agudas destes
2171 indivíduos à estas mudanças.

2172 De acordo como o exposto no terceiro manuscrito da presente Tese, são apresentados os
2173 resultados obtidos a partir da análise do transcriptoma no fígado de indivíduos de *H.*
2174 *luetkenii* expostos às quatro condições experimentais. Além disso, foram obtidos
2175 resultados correspondentes de expressão diferencial e análise de identidade das
2176 sequências, a qual foi realizada com base no transcriptoma de *Astyanax mexicanus*, uma
2177 espécie filogeneticamente próxima a *H. luetkenii*. Os resultados de expressão diferencial
2178 evidenciam como as duas agrupações de *H. luetkenii* estudadas (CC e PP), quando
2179 mantidas nos seus ambientes de origem, apresentam padrões de expressão diferentes.
2180 Nesse caso, 521 genes foram superexpressos e 549 genes foram inibidos nos peixes
2181 coletados e mantidos no local contaminado (PP). A partir dos quatro grupos de peixes
2182 analisados, estes dois grupos (CC e PP) são os que apresentaram as maiores diferenças.
2183 Porém, os resultados nos grupos de peixes translocados evidenciam que, grande parte
2184 das diferenças entre os peixes CC e PP, fazem parte de uma série de processos
2185 regulatórios, o que é verificado pela alta representatividade dos genes induzidos (21
2186 genes, 46,6%) e inibidos no grupo CP, em comum com o grupo PP. Nos apêndices 1, 2,
2187 3 e 4 do terceiro manuscrito, são apresentadas as tabelas com a análise de ontologia
2188 genética para os genes diferencialmente expressos nas diversas comparações entre os
2189 grupos experimentais testados, além das nuvens de dados que refletem, pelo tamanho da
2190 letra e intensidade de cor, os termos mais frequentes que fazem parte desta análise.

2191

2192 *Expressão diferencial associada ao estabelecimento de H. luetkenii em ambientes*
2193 *contaminados (genes diferencialmente expressos em comum entre as condições*
2194 *experimentais CC-CP e CC-PP)*

2195 A análise de enriquecimento dos genes diferencialmente expressos em comum entre
2196 CC-PC e CC-PP, na qual são identificados os processos que estão sendo alterados em
2197 cada condição experimental a partir do grupo de sequências diferencialmente expressas
2198 para cada condição, permitiu a identificação da indução de processos principalmente
2199 relacionados com a ligação (GO:0005488) de diversos tipos de moléculas, tais como
2200 íons, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros. De particular interesse para o presente
2201 estudo, pode-se destacar a indução de genes associados à ligação de íons tais como a
2202 metaloproteinase de matriz 16-like (ENSAMXG00000000095) e o receptor nuclear da
2203 subfamília 5 grupo A membro 2a (ENSAMXG00000017580), gene que também está
2204 implicado em processos de resposta à hormônios esteroides e outras substâncias
2205 lipídicas. Estes dois genes usam o Zn como cofator, e de fato, o termo “substâncias
2206 dependentes de Zn” aparece como uma das palavras chaves mais representativas deste
2207 grupo de dados. Outro processo que foi induzido é aquele relacionado com o
2208 metabolismo de esteróides (GO:0008202), caracterizado pelos genes CYP7A1
2209 (ENSAMXG00000009436), cuja proteína catalisa a primeira reação do catabolismo do
2210 colesterol no fígado; a fosfolipase A2 (ENSAMXG00000019834), que catalisa a
2211 hidrólise de ácidos graxos, disponibilizando ácidos graxos livres; e a hidroxí-delta-5-
2212 esteróide desidrogenase, que tem um papel fundamental na biossíntese de hormônios
2213 esteróides.

2214 Por outro lado, a análise de enriquecimento dos genes inibidos em comum entre os
2215 grupos as condições experimentais CC-CP e CC-PP, indica que, surpreendentemente, o
2216 processo de ligação a íons (GO:0043167) também aparece como uma função molecular
2217 bastante representativa, caracterizada pelo receptor nuclear da subfamília 1 grupo d
2218 membro 1 (ENSAMXG00000015855); o gene da ependimina 2-like
2219 (ENSAMXG00000020238); bem como algumas outras sequências associadas à esta
2220 função, mas que ainda não foram catalogadas (ENSAMXG00000018483,
2221 ENSAMXG00000020478). O processo de ligação a lipídeos também aparece entre as
2222 funções inibidas, representado pelo receptor nuclear citados acima, bem como a
2223 apolipoproteína A-IV (ENSAMXG00000009607). Devido ao papel central das
2224 apolipoproteínas para a disponibilidade de lipídeos (Dominiczak e Caslake, 2011),

2225 juntamente com a indução de diversos genes implicados na transformação de
2226 substâncias esteróides e lipídicas, foi verificado que o metabolismo lipídico é um dos
2227 processos mais afetados pela exposição aguda ou crônica à mistura de metais.
2228 Experimentos agudos com Cu em no peixe *Gasterosteus aculeatus* também
2229 demonstraram alterações significativas na expressão de genes associados à biossíntese e
2230 o metabolismo do colesterol (Santos et al., 2010). Além disso, tem sido demonstrado
2231 que exposições crônicas a metais podem afetar o crescimento em peixes, por alterações
2232 no metabolismo de lipídios e carboidratos (Levesque et al., 2002). Ainda assim, os
2233 resultados apresentados no presente estudo evidenciam que estas mudanças na
2234 expressão gênica em *H.luetkenii* podem ser rapidamente ajustadas, como no caso dos
2235 grupos de peixes CC-CP, ou permanecer como padrões de expressão, como no caso dos
2236 grupos de peixes CC-PP, com a finalidade de garantir o estabelecimento e o sucesso
2237 ecológico das agrupações de peixes que habitam ambientes historicamente
2238 contaminados por mistura de metais.

2239

2240 *Expressão diferencial associada à translocação (Expressão diferencial da condição*
2241 *PP-PC e genes DGE em comum nos grupos translocados CP e PC)*

2242 Os resultados da translocação PP-PC evidenciaram a indução da subunidade 7A do gene
2243 da citocromo c oxidase (ENSAMXG00000015985), que está implicado em processos de
2244 transporte de íons (GO:0006811) através da membrana. Dentre estes, pode se destacar
2245 os cátions inorgânicos. Porém, este gene pode também estar envolvido na atividade
2246 oxidase na região hemo-cobre terminal. Adicionalmente, outros genes envolvidos na
2247 atividade de ligação a cátions foram induzidos, tais como a ATPase 4 classe I tipo 8B
2248 (ENSAMXG00000000590), a subunidade 7A do gene da citocromo c oxidase
2249 (previamente descrita), entre outros.

2250 Surpreendentemente, os resultados da translocação do grupo PP-PC evidenciaram a
2251 inibição da atividade de transporte de cátions através da membrana (GO:0008324),
2252 representada por genes como o membro A8 da família 9 de transportadores de solutos
2253 (ENSAMXG00000000696), o receptor colinérgico e nicotínico alfa A2
2254 (ENSAMXG00000000805), o membro 13 da família 39 de transportadores de solutos
2255 (transportador de Zn) (ENSAMXG00000006000), entre outros genes que, quando
2256 transcritos a proteínas, podem alterar o balanço iônico. De fato, alterações no equilíbrio

2257 iônico têm sido previamente descritas como efeitos crônicos dos metais em peixes
2258 (Uren W. et al., 2013).

2259 Adicionalmente, a comparação dos resultados dos grupos translocados permitiu
2260 identificar alterações associadas diretamente com a translocação e não com as respostas
2261 dos animais à condição experimental, que poderiam interferir na interpretação dos
2262 resultados. Dentre estes, o gene que codifica a proteína de ligação a ácidos graxos 2
2263 (ENSAMXG00000006844), que tem como função principal ligar ácidos graxos
2264 saturados de cadeia longa e agir também como um sensor para manter a homeostasia
2265 energética, foi induzido. Além deste gene, mais duas sequências
2266 (ENSAMXG00000028935 e ENSAMXG00000028982), cuja identidade e
2267 funcionalidade ainda são desconhecidas, também foram induzidas. Por outro lado, as
2268 expressões dos genes que codificam a ubiquitina-pentidase 18
2269 (ENSAMXG0000000606), que aparece com uma alta representatividade nos
2270 resultados de translocação, e a transglutaminase 2 like (ENSAMXG00000003354),
2271 cuja proteína esta envolvida em processos apoptóticos, foram inibidas.

2272

2273 *Outras diferenças em nível de expressão entre as duas agrupações estudadas (CC-PP)*

2274 Como demonstrado anteriormente, as maiores diferenças em nível de expressão gênica
2275 foram observadas entre os níveis basais dos genes das duas agrupações de peixes
2276 estudadas (CC-PP), sendo que algumas destas diferenças coincidiram com aquelas
2277 apresentadas nos peixes translocados do local não contaminado para o local
2278 contaminado (CP). Na situação particular da comparação entre as duas agrupações
2279 (Apêndice 3), pôde-se verificar que o termo “metaloenzimas” aparece frequentemente,
2280 tanto para os genes altamente expressos quanto para os genes que apresentaram baixos
2281 níveis de expressão, refletindo assim uma forte regulação-modulação deste tipo de
2282 moléculas, entre as duas agrupações. Devido ao fato de que as análises foram
2283 desenvolvidas com organismos no ambiente natural, múltiplos estímulos (interferentes
2284 ou indesejados) poderiam estar influenciando algumas respostas dos organismos, além
2285 de ter que se considerar a alta sensibilidade da técnica. Portanto, é necessário enfatizar
2286 sobre a necessidade de se realizar uma cuidadosa interpretação dos resultados, de
2287 elaborar um cuidadoso desenho experimental, bem como de realizar um aprimorado
2288 processo de normalização dos resultados (Han et al., 2015).

2289

2290 Intestino

2291 O intestino é um órgão chave para compreender os efeitos tóxicos de metais como Cu,
2292 devido ao seu papel na incorporação das substâncias pela dieta. Os níveis basais de
2293 expressão do gene que codifica para MTF-1 evidenciaram que os peixes coletados e
2294 mantidos no local não contaminado (CC) apresentam altos níveis de expressão deste
2295 gene, níveis estes que diminuem significativamente após 96 h de translocação dos
2296 peixes do local não contaminado para o local contaminado (CP), mas que são ainda
2297 mais baixos nos peixes coletados e mantidos no local contaminado (PP). Cabe salientar
2298 que a expressão do gene que codifica para MTF-1 em resposta a este tipo de
2299 experimento tem sido pouco estudada, ainda mais no intestino. Sendo assim, os
2300 resultados obtidos no presente estudo é um primeiro passo para a compreensão de como
2301 a expressão deste gene é afetada por misturas complexas de metais.

2302 Por outro lado, a indução significativa na expressão do gene que codifica para MTF-1
2303 nos peixes coletados no local não contaminado e translocados para o local contaminado
2304 (CP), pode ser vista como uma resposta de proteção previsível, ainda mais no intestino.
2305 Embora em outros eucariotas tenha sido descrita uma forte correlação entre a expressão
2306 de MTF-1 e MT (Balamurugan e Schaffner, 2006; Günther et al., 2012 ; Selvaraj et al.,
2307 2005), esta relação não foi observada para a isoforma de MT avaliada no presente
2308 estudo, em nenhum dos tecidos analisados. Porém, não se pode destacar a possibilidade
2309 de que uma outra isoforma ou variante codificante para MT não esteja sendo regulada,
2310 ainda mais que a análise do transcrito de *H.luetkenii* revelou mais 5 sequências
2311 codificantes relacionadas.

2312 Os baixos níveis de expressão do gene que codifica para a ATP7A nos peixes coletados
2313 no local contaminado e translocados para o local não contaminado (PC), sugerem uma
2314 baixa necessidade de excreção de Cu, por parte destes organismos. Por outro lado, os
2315 altos níveis de expressão do gene que codifica para o CTR1 no intestino dos peixes
2316 coletados e mantidos no local não contaminado (CC), indicam a necessidade destes
2317 organismos em incorporar Cu ativamente pela dieta. Embora a translocação não tenha
2318 produzido mudanças significativas na expressão dos transportadores, tem sido
2319 previamente reportada uma alta dependência entre a expressão destes genes e os níveis
2320 ambientais de Cu, principalmente quando o Cu está acompanhado do Fe (Craig et al.,
2321 2009; Leung et al., 2014).

2322

2323 Músculo

2324 Neste tecido, nenhum dos parâmetros analisados (expressão gênica e acumulação de
2325 metais) apresentou alterações significativas em resposta aos tratamentos experimentais,
2326 o que corrobora com o fato de que os processos de incorporação e excreção de metais se
2327 localizam em outros órgãos, e que o musculo não é um alvo principal para acumulação
2328 destes contaminantes (Jia et al., 2017).

2329

2330 **Conclusões Gerais**

2331

2332 As respostas apresentadas pelo peixe dulcícola *H.luetkenii*, em nível de expressão
2333 gênica, frente à exposição crônica a contaminação por metais, principalmente o Cu,
2334 podem ser interpretadas como sendo parte dos processos regulatórios que podem se
2335 manter a o longo do tempo.

2336 As diferenças observadas podem ser rapidamente moduladas, como discutido a partir
2337 dos resultados do experimento de translocação (CC-CP) e demonstrados pela expressão
2338 dos genes que codificam o MTF-1 (fígado e intestino) e as MT (em brânquias, fígado e
2339 intestino). Isto reflete a possível ativação de diversos mecanismos de proteção por parte
2340 destes organismos frente ao potencial tóxico das elevadas concentrações ambientais de
2341 Cu. Adicionalmente, as diferenças de expressão do gene que codifica para o CTR1 no
2342 intestino dos peixes CC-PP e sua inibição no fígado dos peixes CC-CP são claras
2343 evidências de que a diminuição na incorporação dos metais pode ser uma outra
2344 alternativa de proteção. Portanto, foram evidenciadas diversas respostas tecido-
2345 específicas que dão conta dos mecanismos de resposta em um nível orgânico.

2346 As grandes mudanças observadas em nível de transcriptoma no fígado de *H.luetkenii* se
2347 refletem como processos relacionados com a modulação de metaloenzimas direcionados
2348 ao transporte e ligação de íons, ao metabolismo de esteróides, entre outros, e não estão,
2349 portanto, particularmente direcionados aos processos de detoxificação, o que reflete o
2350 grande potencial destes organismos para lidar adequadamente com a contaminação
2351 ambiental crônica por metais.

2352

2353
2354
2355
2356
2357
2358
2359
2360
2361
2362
2363
2364
2365
2366
2367
2368
2369
2370
2371
2372
2373
2374
2375
2376
2377
2378
2379
2380
2381
2382
2383
2384
2385
2386
2387
2388
2389
2390
2391
2392
2393
2394
2395
2396
2397
2398
2399
2400
2401
2402

Bibliografia Geral

- Aldrovandi, P., 2012. Avaliação da contaminação por metais na área das Minas do Camaquã. <http://hdl.handle.net/10183/64071>
- Andrews, G.K., 2001. Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *Biometals* 14, 223–237. <https://doi.org/10.1023/A:1012932712483>
- Balamurugan, K., Schaffner, W., 2006. Copper homeostasis in eukaryotes: Teetering on a tightrope. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Cell Biology of Metals* 1763, 737–746. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.001>
- 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. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652001000200011>
- Choi, S., J. Bird, A., 2014. Zinc'ing sensibly: controlling zinc homeostasis at the transcriptional level. *Metallomics* 6, 1198–1215. <https://doi.org/10.1039/C4MT00064A>
- Bozinovic, G., Oleksiak, M.F., 2011. Genomic approaches with natural fish populations from polluted environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 283–289. <https://doi.org/10.1002/etc.403>
- Carvalho, F.R. de, Malabarba, L.R., Lenz, A.J., Fukakusa, C.K., Guimarães, T. de F.R., Sanabria, J.A.F., Moraes, A.C. de, 2012. Ictiofauna da Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sul do Brasil: composição e diversidade. *Rev. Bras. Biociências* 10, 26. <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1895>
- Chen, K., Rajewsky, N., 2007. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat. Rev. Genet.* 8, 93–103. <https://doi.org/10.1038/nrg1990>
- Cowan, J.A., 1997. *Inorganic Biochemistry: An Introduction*. John Wiley & Sons.
- Craig, P.M., Galus, M., Wood, C.M., McClelland, 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, R362–R373. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90581.2008>
- da Silva, E.S., Abril, S.I.M., Zanette, J., Bianchini, A., 2014. Salinity-dependent copper accumulation in the guppy *Poecilia vivipara* is associated with CTR1 and ATP7B transcriptional regulation. *Aquat. Toxicol.* 152, 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.024>
- Dalton, T.P., Solis, W.A., Nebert, D.W., Carvan III, M.J., 2000. Characterization of the MTF-1 transcription factor from zebrafish and trout cells. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 126, 325–335. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00182-6](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00182-6)
- De Wit, P., Pespeni, M.H., Palumbi, S.R., 2015. SNP genotyping and population

2403 genomics from expressed sequences – current advances and future possibilities. *Mol.*
2404 *Ecol.* 24, 2310–2323. <https://doi.org/10.1111/mec.13165>
2405
2406 Dominiczak, M.H., Caslake, M.J., 2011. Apolipoproteins: metabolic role and clinical
2407 biochemistry applications. *Ann. Clin. Biochem.* 48, 498–515.
2408 <https://doi.org/10.1258/acb.2011.011111>
2409
2410 Eyckmans, M., Benoot, D., Van Raemdonck, G.A.A., Zegels, G., Van Ostade, X.W.M.,
2411 Witters, E., Blust, R., De Boeck, G., 2012. Comparative proteomics of copper exposure
2412 and toxicity in rainbow trout, common carp and gibel carp. *Comp. Biochem. Physiol.*
2413 *Part D Genomics Proteomics* 7, 220–232. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2012.03.001>
2414
2415 Festa, R.A., Thiele, D.J., 2011. Copper: An essential metal in biology. *Curr. Biol.* 21,
2416 R877–R883. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.040>
2417
2418 Finkelstein, J., 2009. Metalloproteins. *Nature* 460, 813–813.
2419 <https://doi.org/10.1038/460813a>
2420
2421 Förstner, U., Wittmann, G.T.W., 2012. *Metal Pollution in the Aquatic Environment.*
2422 Springer Science & Business Media. DOI: 10.1007/978-3-642-96511-1
2423
2424 Giedroc, D.P., Chen, X., Apuy, J.L., 2001. Metal Response Element (MRE)-Binding
2425 Transcription Factor-1 (MTF-1): Structure, Function, and Regulation. *Antioxid. Redox*
2426 *Signal.* 3, 577–596. <https://doi.org/10.1089/15230860152542943>
2427
2428 Grosell, M., Wood, C.M., 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms
2429 of apical entry. *J. Exp. Biol.* 205, 1179–1188.
2430
2431 Günther, V., Lindert, U., Schaffner, W., 2012. The taste of heavy metals: Gene
2432 regulation by MTF-1. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Cell Biology of*
2433 *Metals* 1823, 1416–1425. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.005>
2434
2435 Han, Y., Gao, S., Muegge, K., Zhang, W., Zhou, B., 2015. Advanced Applications of
2436 RNA Sequencing and Challenges. *Bioinforma. Biol. Insights* 9, 29–46.
2437 <https://doi.org/10.4137/BBI.S28991>
2438
2439 Hansen, B.H., Garmo, Ø.A., Olsvik, PÅ.A., Andersen, R.A., 2007. Gill metal binding
2440 and stress gene transcription in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to metal
2441 environments: The effect of pre-exposure in natural populations. *Environ. Toxicol.*
2442 *Chem.* 26, 944–953. <https://doi.org/10.1897/06-380R.1>
2443
2444 Hobert, O., 2008. Gene Regulation by Transcription Factors and MicroRNAs. *Science*
2445 319, 1785–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1151651>
2446
2447 Hoekstra, H.E., Coyne, J.A., 2007. The Locus of Evolution: *Evo Devo* and the Genetics
2448 of Adaptation. *Evolution* 61, 995–1016. [https://doi.org/10.1111/j.1558-](https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00105.x)
2449 [5646.2007.00105.x](https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00105.x)
2450
2451 Jia, Y., Wang, L., Qu, Z., Wang, C., Yang, Z., 2017. Effects on heavy metal
2452 accumulation in freshwater fishes: species, tissues, and sizes. *Environ. Sci. Pollut. Res.*

2453 24, 9379–9386. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8606-4>

2454

2455 Kavembe, G.D., Franchini, P., Irisarri, I., Machado-Schiaffino, G., Meyer, A., 2015.

2456 Genomics of Adaptation to Multiple Concurrent Stresses: Insights from Comparative

2457 Transcriptomics of a Cichlid Fish from One of Earth’s Most Extreme Environments, the

2458 Hypersaline Soda Lake Magadi in Kenya, East Africa. *J. Mol. Evol.* 81, 90–109.

2459 <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9696-6>

2460

2461 Kelly, S.A., Panhuis, T.M., Stoehr, A.M., 2012. Phenotypic Plasticity: Molecular

2462 Mechanisms and Adaptive Significance, in: *Comprehensive Physiology*. American

2463 Cancer Society, pp. 1417–1439. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110008>

2464

2465 Konrad H. G., Paloski N. I., 2000. Fauna da região das Minas do Camaquã, Sub-Bacia

2466 do Arroio João Dias. In *Minas do Camaquã, um Estudo Multidisciplinar*. Unisinos, São

2467 Leopoldo.

2468

2469 La Fontaine, S., Mercer, J.F.B., 2007. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and

2470 ATP7B: Role in copper homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.*, Highlight Section:

2471 Copper and zinc in cell signaling and disease 463, 149–167.

2472 <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.04.021>

2473

2474 Lam, K.L., Ko, P.W., Wong, J.K.-Y., Chan, K.M., 1998. Metal toxicity and

2475 metallothionein gene expression studies in common carp and tilapia. *Mar. Environ.*

2476 *Res., Pollutant Responses in Marine Organisms* 46, 563–566.

2477 [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(98\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(98)00008-7)

2478

2479 Larsen, P.F., Schulte, P.M., Nielsen, E.E., 2011. Gene expression analysis for the

2480 identification of selection and local adaptation in fishes. *J. Fish Biol.* 78, 1–22.

2481 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02834.x>

2482

2483 Laybauer L., 1998. Avaliação do estado da qualidade das águas e da contaminação.

2484 *Rev. Bras. Recur. Hidr.* 3, 29–36.

2485

2486 Leung, K.P., Chen, D., Chan, K.M., 2014. Understanding copper sensitivity in zebrafish

2487 (*Danio rerio*) through the intracellular localization of copper transporters in a hepatocyte

2488 cell-line ZFL and the tissue expression profiles of copper transporters. *Metallomics* 6,

2489 1057–1067. <https://doi.org/10.1039/C3MT00366C>

2490

2491 Levesque, H.M., Moon, T.W., Campbell, P.G.C., Hontela, A., 2002. Seasonal variation

2492 in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically

2493 exposed to metals in the field. *Aquat. Toxicol.* 60, 257–267.

2494 [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00012-7)

2495

2496 Liberles, D.A., Teichmann, S.A., Bahar, I., Bastolla, U., Bloom, J., Bornberg-Bauer, E.,

2497 Colwell, L.J., de Koning, A.P.J., Dokholyan, N.V., Echave, J., Elofsson, A., Gerloff,

2498 D.L., Goldstein, R.A., Grahnen, J.A., Holder, M.T., Lakner, C., Lartillot, N., Lovell,

2499 S.C., Naylor, G., Perica, T., Pollock, D.D., Pupko, T., Regan, L., Roger, A., Rubinstein,

2500 N., Shakhnovich, E., Sjölander, K., Sunyaev, S., Teufel, A.I., Thorne, J.L., Thornton,

2501 J.W., Weinreich, D.M., Whelan, S., 2012. The interface of protein structure, protein

2502 biophysics, and molecular evolution. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 21, 769–785.

2503 <https://doi.org/10.1002/pro.2071>
2504
2505
2506 Luikart, G., England, P.R., Tallmon, D., Jordan, S., Taberlet, P., 2003. The power and
2507 promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nat. Rev. Genet.*
2508 4, 981–994. <https://doi.org/10.1038/nrg1226>
2509
2510 Miller, A.C., Obholzer, N.D., Shah, A.N., Megason, S.G., Moens, C.B., 2013. RNA-
2511 seq–based mapping and candidate identification of mutations from forward genetic
2512 screens. *Genome Res.* 23, 679–686. <https://doi.org/10.1101/gr.147322.112>
2513
2514 Miyata, T., Yasunaga, T., 1980. Molecular evolution of mRNA: A method for
2515 estimating evolutionary rates of synonymous and amino acid substitutions from
2516 homologous nucleotide sequences and its application. *J. Mol. Evol.* 16, 23–36.
2517 <https://doi.org/10.1007/BF01732067>
2518
2519 Nunes, B., Brandão, F., Sérgio, T., Rodrigues, S., Gonçalves, F., Correia, A.T., 2014.
2520 Effects of environmentally relevant concentrations of metallic compounds on the
2521 flatfish *Scophthalmus maximus*: biomarkers of neurotoxicity, oxidative stress and
2522 metabolism. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 7501–7511. [https://doi.org/10.1007/s11356-
2523 014-2630-4](https://doi.org/10.1007/s11356-014-2630-4)
2524
2525 Pierron, F., Normandeau, E., Defo, M.A., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture,
2526 P., 2011. Effects of chronic metal exposure on wild fish populations revealed by high-
2527 throughput cDNA sequencing. *Ecotoxicology* 20, 1388–1399.
2528 <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0696-z>
2529
2530 Qian, X., Ba, Y., Zhuang, Q., Zhong, G., 2014. RNA-Seq Technology and Its
2531 Application in Fish Transcriptomics. *OMICS J. Integr. Biol.* 18, 98–110.
2532 <https://doi.org/10.1089/omi.2013.0110>
2533
2534 Romero, I.G., Ruvinsky, I., Gilad, Y., 2012. Comparative studies of gene expression
2535 and the evolution of gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 13, 505–516.
2536 <https://doi.org/10.1038/nrg3229>
2537
2538 Ronchi, L. H., Lobato, A. O. C., 2000. Avaliação do estado da qualidade das águas e da
2539 contaminação dos sedimentos recentes do arroio João Dias após encerramento das
2540 atividades das minas do Camaquã, RS." LH Ronchi & AOC Lobato. Minas do
2541 Camaquã, um estudo multidisciplinar. UNISINOS.
2542
2543 Rubino, J.T., Franz, K.J., 2012. Coordination chemistry of copper proteins: How nature
2544 handles a toxic cargo for essential function. *J. Inorg. Biochem.* 107, 129–143.
2545 <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024>
2546
2547 Santos, E.M., Ball, J.S., Williams, T.D., Wu, H., Ortega, F., van Aerle, R., Katsiadaki,
2548 I., Falciani, F., Viant, M.R., Chipman, J.K., Tyler, C.R., 2010. Identifying Health
2549 Impacts of Exposure to Copper Using Transcriptomics and Metabolomics in a Fish
2550 Model. *Environ. Sci. Technol.* 44, 820–826. <https://doi.org/10.1021/es902558k>
2551
2552 Selvaraj, A., Balamurugan, K., Yepiskoposyan, H., Zhou, H., Egli, D., Georgiev, O.,

2553 Thiele, D.J., Schaffner, W., 2005. Metal-responsive transcription factor (MTF-1)
2554 handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes.
2555 *Genes Dev.* 19, 891–896. <https://doi.org/10.1101/gad.1301805>
2556

2557 Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., Svobodova, Z., 2011. Metals as a cause of
2558 oxidative stress in fish: a review. *Veterinární Medicína* 56, 537–546. DOI:
2559 10.17221/4272-VETMED.
2560

2561 Sharp, P.A., 2003. Ctr1 and its role in body copper homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell*
2562 *Biol.* 35, 288–291. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00134-6](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00134-6)
2563

2564 Spitz, F., Furlong, E.E.M., 2012. Transcription factors: from enhancer binding to
2565 developmental control. *Nat. Rev. Genet.* 13, 613–626. <https://doi.org/10.1038/nrg3207>
2566

2567 Storey, J.M., Storey, K.B., 2000. *Environmental Stressors and Gene Responses Volume*
2568 *1*, 1st Edition. Elsevier.
2569

2570 Uren W., T.M., Bury, N., van Aerle, R., Santos, E.M., 2013. Global Transcriptome
2571 Profiling Reveals Molecular Mechanisms of Metal Tolerance in a Chronically Exposed
2572 Wild Population of Brown Trout. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8869–8877.
2573 <https://doi.org/10.1021/es401380p>
2574

2575 Warnefors, M., Kaessmann, H., 2013. Evolution of the Correlation between Expression
2576 Divergence and Protein Divergence in Mammals. *Genome Biol. Evol.* 5, 1324–1335.
2577 <https://doi.org/10.1093/gbe/evt093>
2578

2579 Weiss, F.E., 2013. Sistemática e taxonomia de *Hyphessobrycon luetkenii* (Boulenger,
2580 1887) (CHARACIFORMES: CHARACIDAE). Programa de Pós-Graduação em
2581 Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do
2582 Sul
2583

2584 Whitehead, A., Galvez, F., Zhang, S., Williams, L.M., Oleksiak, M.F., 2011. Functional
2585 Genomics of Physiological Plasticity and Local Adaptation in Killifish. *J. Hered.* 102,
2586 499–511. <https://doi.org/10.1093/jhered/esq077>
2587

2588 Wijmenga, C., Klomp, L.W.J., 2004. Molecular regulation of copper excretion in the
2589 liver. *Proc. Nutr. Soc.* 63, 31–39. <https://doi.org/10.1079/PNS2003316>
2590

2591 Zhao, L., Xia, Z., Wang, F., 2014. Zebrafish in the sea of mineral (iron, zinc, and
2592 copper) metabolism. *Front. Pharmacol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00033>
2593