

TRANSPORTE DE CÁLCIO EM INTERAÇÃO COM O COBRE EM CÉLULAS BRANQUIAIS
DO CARANGUEJO DE MANGUE *Ucides cordatus*

PESQUISADORA LÍDER: FLAVIA PINHEIRO ZANOTTO

PROJETO MACKPESQUISA

AGOSTO 2011

RESUMO

O cálcio tem papel fundamental na biomineralização do rígido exoesqueleto externo dos crustáceos e, dessa maneira, o crescimento e a fisiologia desses animais estão intimamente ligados ao ciclo da muda e às diferentes estratégias para disponibilizar esse íon. Os crustáceos são também freqüentemente utilizados como bioindicadores e biomonitores em diversos sistemas aquáticos porque estão distribuídos em diferentes habitats, sujeitos a contaminações por metais pesados. Portanto, os crustáceos podem ser utilizados como modelo para o estudo de mecanismos celulares da homeostase do íon cálcio em interação com metais. O caranguejo a ser estudado, o *Ucides cordatus*, é uma espécie semi-terrestre, exclusiva de áreas de manguezais, que são locais também contaminados por metais. O presente trabalho visa estudar a interação em nível celular do Ca^{2+} (cálcio) com o metal Cu^{2+} (cobre). Para isso, células de brânquias foram isoladas e marcadas com marcadores fluorescentes para Cu^{2+} e o transporte de Ca^{2+} foi medido isoladamente e em conjunto com Cu^{2+} adicionado à solução salina onde se encontram as células. Além disso, marcadores bioquímicos para stress foram utilizados para evidenciar o efeito do Cu^{2+} em animais expostos a diferentes concentrações desse metal no meio aquático. Os resultados mostram que o Cu é estimulado pela entrada de Ca, provavelmente via canais para Ca e via Cu-ATPase. A exposição dos animais ao Cu, eleva a atividade da Na/K - ATPase e causa alterações no metabolismo da glicose, juntamente com um aumento da proteína metalotioneína, em proporção direta ao tempo de exposição ao Cu na água.

INTRODUÇÃO

Os crustáceos constituem um grupo muito diverso de organismos, que habitam uma variedade grande de ecossistemas incluindo água doce, marinho e terrestre, devido à ampla radiação evolutiva do grupo (LUCU E TOWLE, 2003). Os crustáceos possuem exoesqueleto composto por quitina e carbonato de cálcio, apresentando um crescimento descontínuo, caracterizado por mudas, que envolvem a perda do exoesqueleto e retirada de cálcio do meio ambiente por epitélios próprios para este transporte, como as brânquias e o hepatopâncreas. Desse modo, estes animais podem ser utilizados como modelo para o estudo de mecanismos celulares da homeostase do íon cálcio (WHEATLY, 1996, 1999). Os crustáceos são também frequentemente utilizados como bioindicadores e biomonitores em diversos sistemas aquáticos porque estão distribuídos em diferentes habitats, sujeitos a contaminações por metais pesados, possuindo portanto um grande interesse em investigações comparativas (MARTINEZ *et al.*, 1999; SÁ (Sa *et al.*, 2010) *et al.*, 2008, (Sá *et al.*, 2008).

O caranguejo *Ucides cordatus* é uma espécie semi-terrestre exclusiva de áreas de manguezais e sua distribuição vai desde a Flórida (EUA) até Laguna, Santa Catarina (Brasil). Este caranguejo pode servir como fonte de alimentação para a população, possuindo, portanto, um grande valor econômico. O *Ucides cordatus* é hiper-hiporregulador, atuando no processamento de serrapilheira e do fluxo energético. É considerado como o maior dos *Ocypodidae* e faz incursões terrestres na maré baixa e, quando se alimentam, ficam várias horas expostos ao ar. Portanto, esta espécie fica naturalmente exposta a flutuações de salinidade nos manguezais a partir de 2‰ até 33‰, principalmente regida pelas marés (MARTINEZ *et al.*, 1999)

1. Transporte de Cálcio

O cálcio é um osmólito pouco significativo para a variação/manutenção da osmolalidade da hemolinfa em crustáceos, e se mantém regulado em valores próximos de 12 mM na hemolinfa. Essa acentuada regulação também ocorre nas concentrações intracelulares de cálcio. Isso é aparentemente explicado pelas diferentes funções que este íon desempenha como mensageiro intermediário durante a sinalização celular, ativação de enzimas intramitocondriais e no controle dos mecanismos de contração muscular (GUNTER *et al.* 2004). Além das funções celulares, o cálcio tem papel fundamental na biomineralização do rígido exoesqueleto externo dos crustáceos e, dessa maneira, o crescimento e a fisiologia desses animais estão intimamente ligados ao ciclo da muda e às diferentes estratégias para disponibilizar esse íon.

Dentre os epitélios especializados na troca bidirecional de cálcio em caranguejos estão as brânquias, que são o local de perda passiva de cálcio e tomada ativa nas espécies aquáticas, podendo também modificar o conteúdo pós-renal do cátion na urina de espécies terrestres (WOLCOTT & WOLCOTT, 1985, 1991; WOLCOTT, 1992; GREENAWAY & MORRIS, 1989; GREENAWAY *et al.*; 1990; MORRIS *et al.*, 1991; MORRIS, 2001), e no hepatopâncreas, onde ocorrem depósitos de cálcio em organelas.

Um modelo proposto por WHEATLY e colaboradores (2002a,b), AHEARN & FRANCO (1993), mostra o transporte de cálcio nos epitélios das brânquias e intestino e sintetiza o transporte de cálcio da água/lúmen para o meio intracelular (através da membrana apical) e do meio intracelular para a hemolinfa (através da membrana basolateral). Todos esses estudos foram feitos, basicamente, com lagostins e lagostas, utilizando-se de vesículas e somente um com caranguejo, *Carcinus maenas* (FLIK *et al.*, 1994; LUCU & FLIK, 1999). O influxo unidirecional (apical para basolateral) de cálcio (brânquias, hepatopâncreas e glândulas antenais na intermuda) ocorre passivamente em favor do gradiente de concentração por difusão facilitada mediada por trocador $\text{Ca}^{2+}/n \text{Na}^{+}$ (ou H^{+}), eletroneutros ou eletrogênicos, e via difusão simples por um canal para cálcio sensível a verapamil e nifedipina. O efluxo ativo basolateral envolve uma cálcio ATPase dependente de calmodulina e sensível a vanadato (PMCA), de alta afinidade e baixa capacidade, e um trocador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), eletroneutro ou eletrogênico, sensível a amiloride, de baixa afinidade e alta capacidade, mantida pela $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPase. O efluxo unidirecional (basolateral para apical) de cálcio (principalmente na pré-muda) pode envolver um canal para cálcio sensível a verapamil e o reverso dos mecanismos já descritos (Zanotto and Wheatly, 2002). Recentemente, o mecanismo de transporte celular de Ca^{2+} foi estudado em um caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* (Sa et al., 2010), revelando que os mecanismos de transporte do Ca^{2+} são muito comuns a todos os crustáceos, seja marinho, dulcícola ou terrestre.

2. Transporte de Cobre

O cobre (Cu) é parte integral do pigmento respiratório, hemocianina, a contar pelos altos índices de cobre observados no hepatopâncreas. Por esse metal ser considerado essencial, também é fonte de grandes regulações, sendo detoxificados pela metalotioneína, eliminados por excreção através das fezes e/ou urina, e via hemolinfa através de órgãos excretórios ou brânquias (Alcorlo et al., 2006).

O Cu pode ser tóxico, modificando a composição lipídica e protéica da membrana celular produzindo grandes quantidades de radicais livres dentro da célula, sendo,

portanto um agente pró-oxidante (CHAVEZ-CROOKER *et al.*, 2003). Para manter a concentração de metais essenciais dentro de limites de tolerância fisiológica, existe um grande número de mecanismos que controlam a ingestão, acúmulo, distribuição e detoxificação desses metais (SHINGLES, 2004), pois qualquer alteração na regulação do cobre pode originar severas conseqüências fisiológicas (Fosset *et al.*, 2005). A regulação homeostática é limitada, e a toxicidade se desenvolve quando acima de limites mínimos (BOSSUYT, 2003). Recentemente diversos estudos com o tecido epitelial de crustáceos indicam que a membrana plasmática, mitocondrial e lisossomal possuem proteínas que atuam no transporte de Ca e de metais pesados como Cu, Zn (zinco) e Cd (cádmio) (MANDAL *et al.*, 2005). Esses estudos sugerem que mecanismos regulatórios da atividade intracelular de Ca podem ser interrompidos ou até mesmo abolidos na presença de concentração significativa de metais pesados (MANDAL *et al.*, 2005).

O transporte de cobre através da membrana plasmática apical das células epiteliais de peixes ocorre por um processo antiporte que troca cobre externo com o sódio, através do antiporte $1\text{Cu}^{2+}/2\text{Na}^{+}$, insensível a amiloride (GROSELL & WOOD, 2002) e de maneira similar ocorre em mitocôndrias de epitélios de lagostas (CHAVEZ-CROOKER *et al.*, 2002). Aparentemente uma Cu-ATPase transporta Cu apicalmente em lagostas (CHAVEZ-CROOKER *et al.*, 2003). O tema central deste modelo assume que há uma ATPase dependente da Cu-ATPase nestas membranas que são inibidas pelo vanadato citoplasmático e estimuladas pelo cálcio (CHAVEZ-CROOKER *et al.*, 2001, 2003). Este modelo indica que existe um estímulo interno da Cu-ATPase pelo cálcio, seguido da passagem pelo canal de cálcio sensível a verapamil. A ativação do transporte de cobre pelo cálcio parece também ocorrer do lado citoplasmático do sistema de transporte (GROSELL & WOOD, 2002). Aparentemente, as células de brânquias acumulam mais Cu do que as células de hepatopancreas em siris (Pagani & Bianchini, 2009), sugerindo uma maior tolerância ao Cu nas células de hepatopancreas.

Portanto, o objetivo do presente projeto foi estudar o transporte de Cu em células de brânquias anteriores e posteriores do caranguejo de mangue *Ucides cordatus*, partindo da hipótese de que o Ca^{2+} e o Cu^{2+} devem interagir no transporte através da membrana plasmática das células branquiais, por serem ambos divalentes.

METODOLOGIA

1.1. Coleta e manutenção dos organismos

A Estância Balneária de Itanhaém possui uma área de 597,4 km², longitude 46 O 47' 15" oeste e latitude 24 O 11' 08" sul. Neste ambiente encontra-se o manguezal que se

localiza em região litorânea estuarina, recebendo tanto água salgada, pela ação das marés, como água doce dos rios que ali desembocam. É um ecossistema costeiro, de transição entre os ambientes terrestre e marinho, característico de regiões costeiras tropicais ou subtropicais, estabelecendo-se nas zonas entre marés e sujeito ao regime das mesmas, com salinidade em torno de 18 UPS (unidade prática de salinidade). Este ambiente apresenta-se favorável e importante local para a reprodução e crescimento de um grande número de caranguejos (IGARASHI, 2008)

Os animais serão coletados no manguezal do município de Itanhaém –SP, com auxílio de peneiras, redes e puçás e transportados em caixas plásticas contendo uma coluna de água de 10 centímetros de altura, com oxigenação mantida por aeradores portáteis.

Serão aclimatados no viveiro da Universidade Presbiteriana Mackenzie (campus capital), em recipientes contendo água do mar a uma salinidade de 20‰ em constante renovação e com acesso livre ao ambiente seco, com fotoperíodo de claro/escuro 12:12 horas e temperatura ambiente de 20-25 °C, onde permanecerão por no mínimo uma semana antes da realização dos experimentos. Será ofertado alimento (carne moída e alface) em dias alternados, sendo a alimentação suspensa durante a realização dos experimentos.

1.2. Movimento e transporte transmembrânico do cálcio

As brânquias de animais em intermuda (n=4) serão utilizados para obtenção de células, conforme descrito por AHEARN *et al.* (2001), CHAVEZ-CROOKER *et al.* (2002), (Sa *et al.*, 2010), modificados para a osmolalidade final próxima à da hemolinfa do animal.

As brânquias serão colocadas em placa de Petri com 15mL de tampão e 150µL de tripsina por 10 minutos e logo após serão cortadas com ajuda de um tesoura em pequenos pedaços. As células em suspensão são filtradas em uma malha de nylon de 200 µm para remoção de tecidos não dissociados e pedaços grandes. O filtrado será transferido para um tubo falcon, onde será centrifugado a 800 rpm por 5 minutos. O “pellet” é resuspenso em 2 ml de solução fisiológica tampão livre de cálcio, juntamente com 1µL do marcador para cálcio FLUO-3 AM-éster (concentração final 4,5 µM, dissolvido em DMSO) e também com 28µL do inibidor de mecanismos de extrusão de ânions orgânicos (em especial derivados do ácido úrico), o *Probenecid*, para assegurar que mesmo em sua forma ativa e pouco permeável à membrana (ácido carboxílico), o cálcio permaneça no meio intracelular. Para isso, as células serão agitadas a 110rpm com o marcador por 1 hora em temperatura ambiente (25°C). Após isso, serão centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos para lavagem do marcador que não penetrou nas células. Novamente o “pellet” será resuspenso em

solução fisiológica com tampão livre de cálcio e 28 μ L de probenecid, permanecendo no gelo.

A quantidade de células em cada experimento foi sempre padronizada para reduzir os erros padrões. Para isso, parte das células foi corada com *Trypan Blue* (10 μ L de corante para 100 μ L de células), que indica a viabilidade celular através de sua passagem ou não pela membrana plasmática, e observada em câmara de Neubauer para contagem. As células coradas de azul foram consideradas inviáveis já que houve entrada do corante através da membrana, e as células translúcidas foram contadas como viáveis. Foi realizada uma média da contagem de quatro quadrantes e o resultado foi multiplicado por 10^4 . O valor padrão estipulado para os experimentos foi de aproximadamente 22×10^4 células por mL de solução. Em caso de soluções com mais ou menos células viáveis do que o valor estipulado foi realizada a concentração ou diluição das mesmas, conforme a necessidade.

As células foram então levadas para o espectrofluorímetro para controle de fluorescência (excitação a 490nm e emissão a 520nm) e caracterização do transporte de cobre nas células branquiais anteriores e posteriores. Em cada poço foram adicionados 180 μ L de células para controle da fluorescência inicial. Em seguida, foram adicionadas concentrações extracelulares de cobre crescentes (0,025 - 0,15 - 0,275 - 0,55 - 1,1 μ M). Para cada concentração, as células foram observadas ao longo de 300 segundos, permitindo a observação da dinâmica do transporte de cobre de acordo com a variação na fluorescência.

Para o transporte de cobre em interação com o cálcio, foram utilizadas as mesmas concentrações de cobre citadas anteriormente (0,025 - 0,15 - 0,275 - 0,55 - 1,1 μ M), em estoques onde também havia cálcio diluído, na concentração de 1 mM. A variação na fluorescência foi analisada durante 300 segundos nas células anteriores e posteriores, para cada diferente concentração.

Por fim, foram utilizados inibidores e ATPases para cálcio, que afetam canais e trocadores de membrana, tanto apical quanto basolateralmente, um por vez. A mudança na fluorescência foi avaliada. Todos os bloqueadores foram estocados protegidos da luz.

1.3. Exposição dos animais ao cobre

Para os experimentos realizados com o transporte de cobre presente na água, os animais foram expostos ao CuSO_4 na concentração de 5mg/L^{-1} de sulfato de cobre por 24 hs, 96 hs e 15 dias, sendo a água trocada diariamente. Foram analisados alguns parâmetros bioquímicos e fisiológicos dos tecidos e fluidos destes animais.

a) Dosagem espectrofotométrica de metalotioneína da hemolinfa e hepatopâncreas de *Ucides cordatus* (VIARENGO *et al.*, 1997).

A metalotioneína, uma proteína de baixo peso molecular, tem sua síntese aumentada quando o animal é exposto a metais pesados, principalmente o cobre. A hemolinfa e hepatopâncreas retirados dos animais ao término do experimento será homogeneizada com 5mL de tampão para cada grama de tecido e centrifugados a 3000g durante 45 minutos. Será retirado 250uL do sobrenadante para adição de 265uL de etanol absoluto (-20°C) e 20uL de clorofórmio e logo em seguida homogeneizado para centrifugação a 6000g à 4°C durante 10 minutos. Desta solução, serão retirados 300uL do sobrenadante, adicionando 20uL de HCl puro (37%), 900uL de etanol puro frio para cada volume de sobrenadante e posterior homogeneização.

As amostras serão armazenadas à -20°C durante 1 hora e centrifugadas a 6000g durante 10 minutos. O pellet será re-suspenso em 1mL de etanol 87% e clorofórmio 1% diluídos em tampão Tris-HCl (20mM) e homogeneizados. Serão adicionados 4.2mL de solução DTNB preparada em solução de trabalho homogeneizadas em vórtex para centrifugação a 3000g durante 5 minutos e a absorbância será lida em espectrofotômetro a 412nm.

b) Determinação da atividade enzimática da Na⁺/K⁺ ATPase branquial de *Ucides cordatus* (biomarcador fisiológico).

As brânquias coletadas serão mantidas em gelo seco até análise em laboratório e posteriormente será feito o descongelamento e homogeneização em tampão imidazol 10mM em pH 7.5 para centrifugação a 2000g durante 20 minutos a 4°C para depósito dos restos celulares.

O ensaio será então realizado com o sobrenadante como fonte enzimática e para esse fim, as amostras de brânquias serão incubadas em 2 tampões, sendo que um deles contém ouabaína 2mM e o segundo não o tem. Todas as amostras serão incubadas durante 30 minutos a 25°C na presença de EDTA (2mM) e o padrão a ser utilizado será o Na₂HPO₄ (10mM) diluído no ensaio e o substrato será tris-ATP (3mM).

A reação será interrompida por adição de 200uL de ácido tricloroacético 50% frio e posteriormente serão centrifugadas a 2000g durante 5 minutos. O fosfato inorgânico liberado será detectado em uma alíquota do sobrenadante da reação utilizando-se reagente contendo ácido ascórbico (20%) e molibdato de amônio (0.84%) em ácido sulfúrico (2N), misturados no momento da utilização.

A leitura será feita em espectrofotômetro a 660 nm e a diferença das leituras utilizando as soluções 1 e 2 será então atribuída à atividade da Na⁺/K⁺ ATPase

(μ moles/mg proteína/hora). O conteúdo de proteínas totais presentes no sobrenadante do homogeneizado será dosado através do método Bradford.

c) Dosagem de lactato e glicose em hemolinfa e urina de *Ucides cordatus*

Uma vez que a exposição ao cobre gera estresse fisiológico, também será verificada a concentração de lactato e glicose na urina e hemolinfa dos animais.

A dosagem será realizada através do método para determinação do lactato em plasma e urina, através da metodologia da lactato desidrogenase. As amostras serão homogeneizadas suavemente e incubadas por 5 minutos a 37°C e determinada a absorbância da amostra em 340nm, acertando o zero com o branco. A absorbância será lida em, no máximo, 30 minutos. A concentração de lactato será dada em mg/dL e consiste na razão entre variação da absorbância da amostra e variação da absorbância padrão, multiplicando pela concentração do padrão.

A determinação da glicose na hemolinfa e urina por método cinético (GOD-Trinder) ou de ponto final e tem como princípio a catálise da oxidação da glicose pela glicose oxidase. As amostras de hemolinfa e urina serão misturadas vigorosamente e incubadas em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. O nível da água no banho-maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 505nm acertando o zero com o branco (contendo somente 1mL do reagente 1 presente no kit de dosagem de glicose). A cor é constante durante 30 minutos.

A concentração de glicose será dada em mg/dL e é a razão entre absorbância do teste e absorbância do padrão, multiplicado por 100.

Resultados

A cinética do transporte de cobre e do transporte de cobre em interação com o cálcio nas brânquias anteriores e posteriores estão representados nas Figuras 1 e 2.

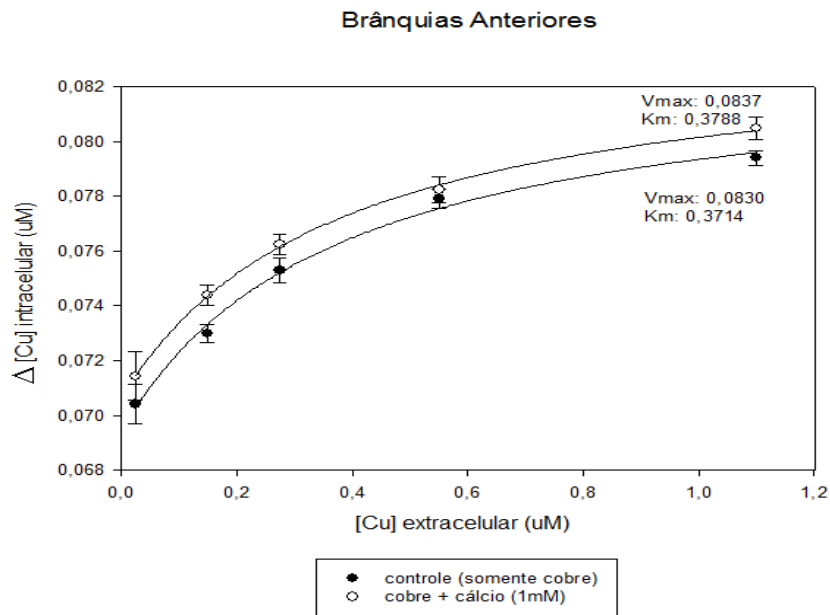


Figura 1: Relação entre a variação da concentração de cobre intracelular (μM) de acordo com a adição de diferentes concentrações de cobre extracelular (μM) com e sem cálcio (mM), em células de brânquias anteriores (N=4 para ambos).

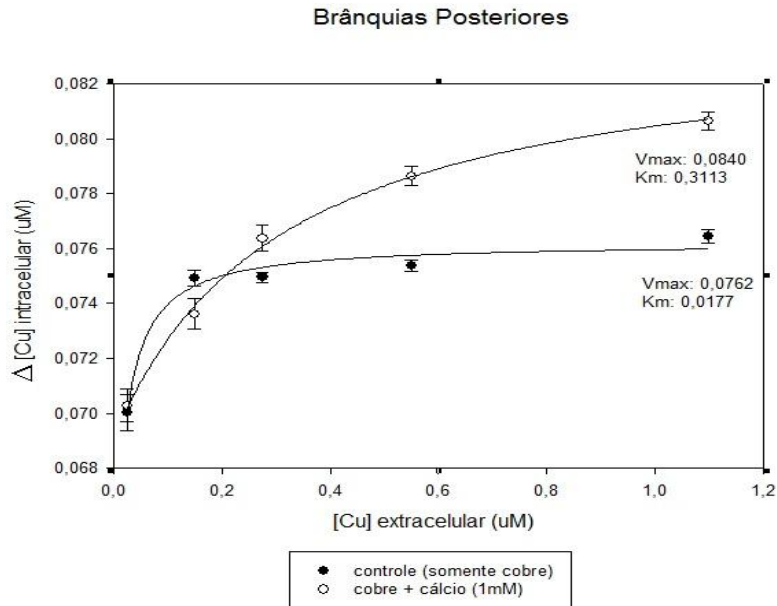


Figura 2: Relação entre a variação da concentração de cobre intracelular (μM) de acordo com a adição de diferentes concentrações de cobre extracelular (μM) com e sem cálcio (mM), em células de brânquias posteriores (N=4 para ambos).

A Figura 1 indica que o transporte de cobre nas brânquias anteriores foi maior quando o meio externo possuía cálcio, como mostram os valores de V_{max} e K_m . Os valores do controle foram V_{max} : 0,0830 e K_m : 0,3714, enquanto que da curva experimental foram V_{max} : 0,0837 e K_m : 0,3788. O mesmo se evidencia na Figura 2, que representa a cinética do transporte nas brânquias posteriores. Os valores do controle foram V_{max} : 0,0762 e K_m : 0,0177, enquanto que no experimental foram V_{max} : 0,0840 e K_m : 0,3113, indicando um transporte ainda maior de cobre para o meio intracelular na presença de cálcio.

Inibidores

a) Nifedipina

A cinética do transporte de cobre em interação com o cálcio nas brânquias anteriores e posteriores na presença do inibidor para canais de Ca, nifedipina (100 μ M, Sá et al., 2010), está representada nas Figuras 3 e 4.

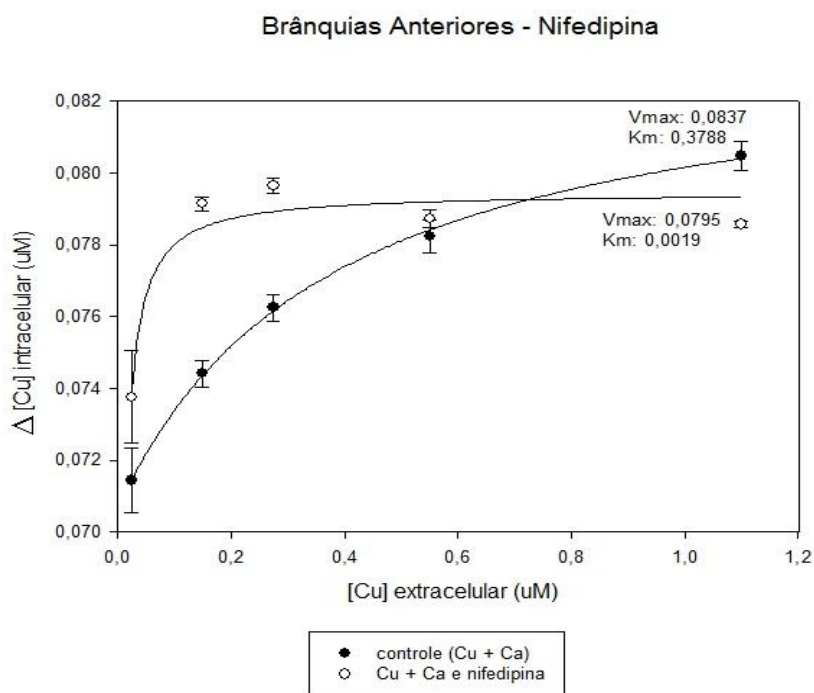


Figura 3: Relação entre a variação da concentração de cobre intracelular (μ M) de acordo com a adição de diferentes concentrações de cobre extracelular (μ M) com cálcio (1 mM), em células de brânquias anteriores na ausência e presença do inibidor nifedipina a 100 μ M (N=3 para ambos).

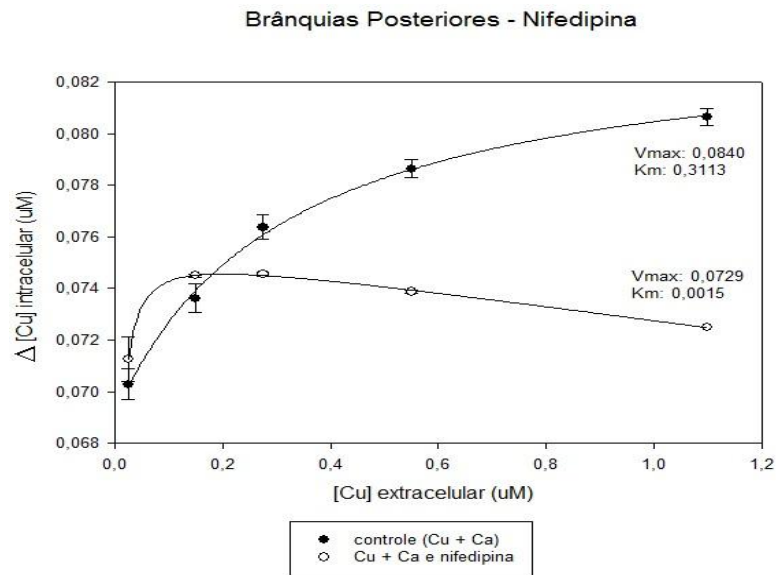


Figura 4: Relação entre a variação da concentração de cobre intracelular (μM) de acordo com a adição de diferentes concentrações de cobre extracelular (μM) com cálcio (1 mM), em células de brânquias posteriores na ausência e presença do inibidor nifedipina 100 μM (N=3 para ambos).

O transporte de cobre em células de brânquias anteriores e posteriores foi diminuído na presença do inibidor nifedipina. As Figuras 3 e 4 indicam que o transporte foi mais afetado nas brânquias posteriores, em cujo controle se observou V_{max} : 0,0840 e K_m : 0,3113 e na curva experimental V_{max} : 0,0729 e K_m : 0,0015. As brânquias anteriores também apresentaram o transporte de cobre afetado na presença da nifedipina, embora menor do que se observou nas brânquias posteriores, com V_{max} : 0,0837 e K_m : 0,3788 no controle e V_{max} : 0,0795 e K_m : 0,0019 no experimental.

b) Vanadato

A cinética do transporte de cobre em interação com o cálcio nas brânquias anteriores e posteriores na presença do inibidor vanadato (20mM) está representada nas Figuras 5 e 6.

Brânquias Anteriores - Vanadato

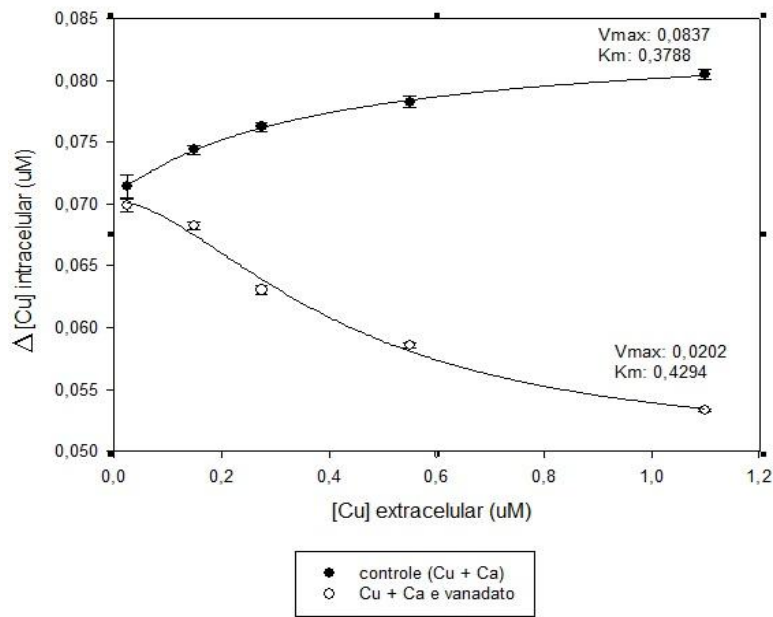


Figura 5: Relação entre a variação da concentração de cobre intracelular (μM) de acordo com a adição de diferentes concentrações de cobre extracelular (μM) com cálcio (1 mM), em células de brânquias anteriores na ausência e presença do inibidor vanadato (N=4 para ambos).

Brânquias Posteriores - Vanadato

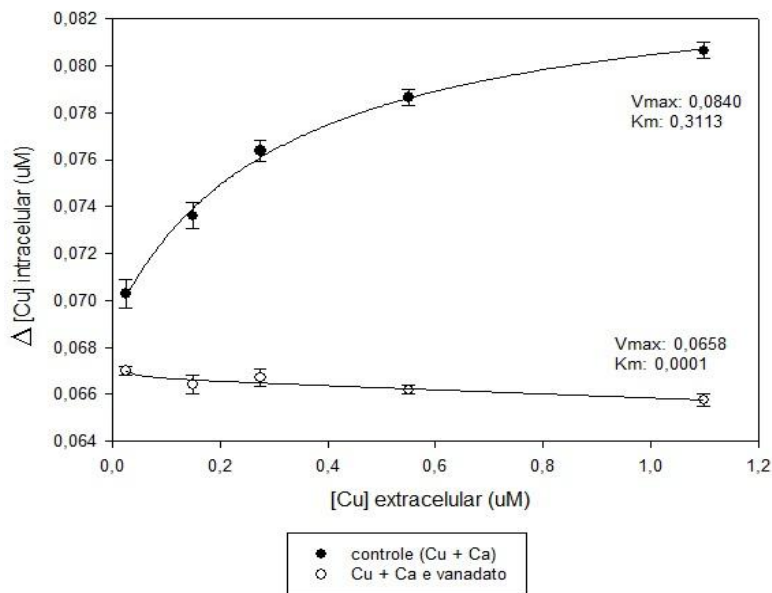


Figura 6: Relação entre a variação da concentração de cobre intracelular (μM) de acordo com a adição de diferentes concentrações de cobre extracelular (μM) com cálcio (1 mM), em células de brânquias posteriores na ausência e presença do inibidor vanadato (N=4 para ambos).

A presença do vanadato inibiu completamente a entrada de cobre nas células branquiais anteriores e posteriores, como mostram as Figuras 5 e 6. Nas brânquias anteriores, observou-se V_{max} : 0,0837 e K_m : 0,3788 no controle e V_{max} : 0,0202 e K_m : 0,4294 na curva correspondente ao vanadato. Os valores das brânquias posteriores foram V_{max} : 0,0840 e K_m : 0,3113 no controle e V_{max} : 0,0658 e K_m : 0,0001 na curva experimental. Tais valores indicam que a inibição pelo vanadato foi maior nas células de brânquias anteriores.

c) Verapamil

A cinética do transporte de cobre em interação com o cálcio nas brânquias anteriores e posteriores na presença do inibidor verapamil (100 μM) está representada nas Figuras 7 e 8.

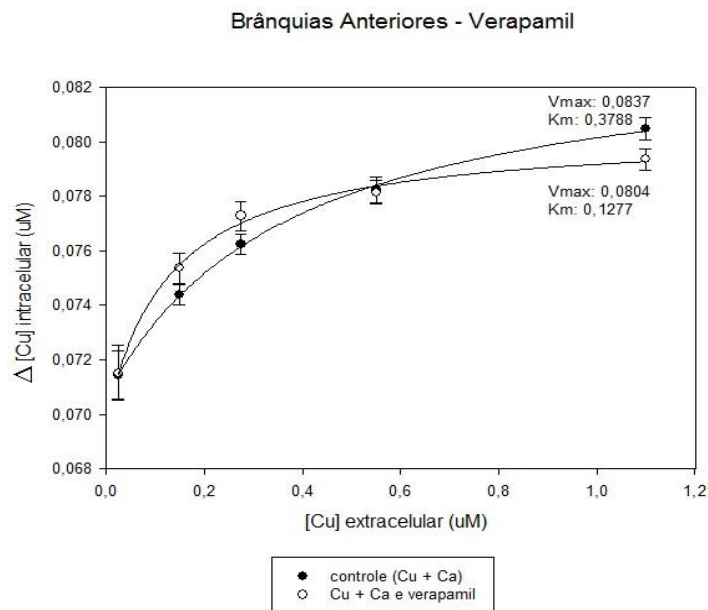


Figura 7: Relação entre a variação da concentração de cobre intracelular (μM) de acordo com a adição de diferentes concentrações de cobre extracelular (μM) com cálcio (1 mM), em células de brânquias anteriores na ausência e presença do inibidor verapamil (N=4 para ambos).

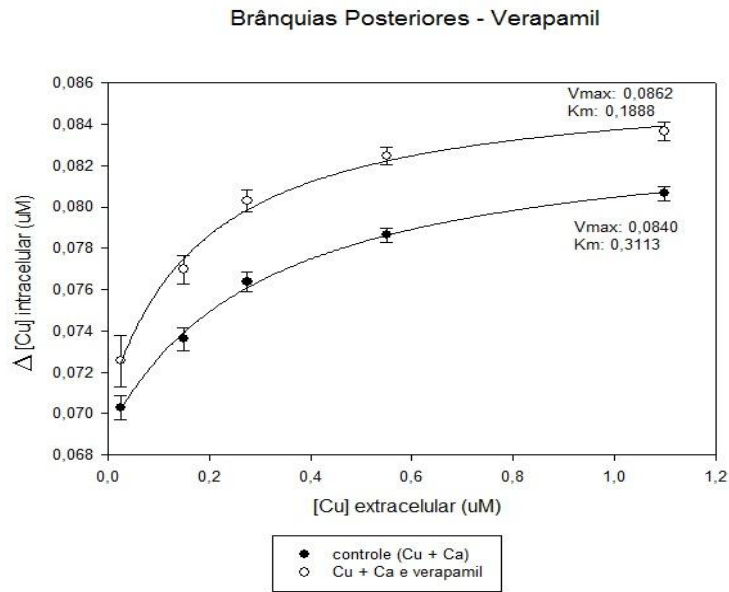


Figura 8: Relação entre a variação da concentração de cobre intracelular (μM) de acordo com a adição de diferentes concentrações de cobre extracelular (μM) com cálcio (1 mM), em células de brânquias posteriores na ausência e presença do inibidor verapamil (N=4 para ambos).

O inibidor verapamil apresentou resultados distintos para brânquias anteriores e posteriores. A Figura 7 indica que a presença do inibidor alterou de forma pouco significativa o transporte de cobre nas brânquias anteriores, com Vmax: 0,0837 e Km: 0,3788 no controle e Vmax: 0,0804 e Km: 0,1277 no experimental. Já nas brânquias posteriores (Figura 8), observou-se um aumento no transporte de cobre na presença de verapamil, com Vmax: 0,0840 e Km: 0,3113 no controle e Vmax: 0,0862 e Km: 0,1888 na curva correspondente ao verapamil.

Medidas de glicose e lactato na hemolinfa e urina dos animais

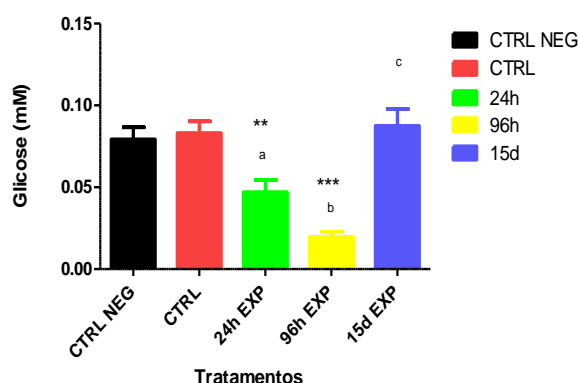


Figura 9: Glicose (mM) na hemolinfa de animais submetidos a CuSO_4 (5mg/L^{-1}) por 24h, 96h e 15dias. O controle negativo (CTRL) são animais retirados dos tanques e a glicose medida e o controle (CTRL) foi submetido às mesmas condições dos animais experimentais. Asteriskos mostram diferenças entre experimental e controle e as letras denotam diferenças entre os diferentes tratamentos.

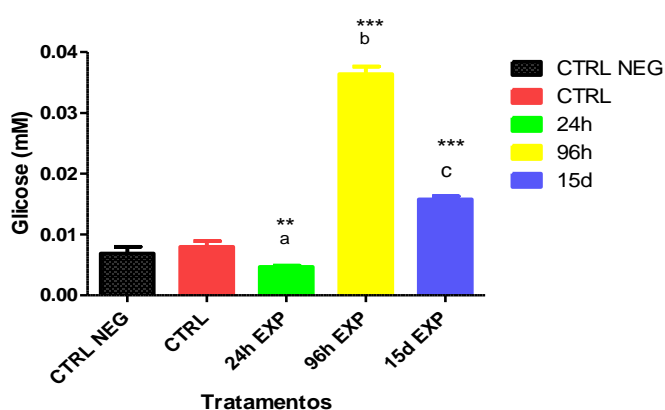


Figura 10: Glicose (mM) na urina de animais submetidos a CuSO_4 (5mg/L^{-1}) por 24h, 96h e 15dias. O controle negativo (CTRL) são animais retirados dos tanques e a glicose medida e o controle (CTRL) foi submetido às mesmas condições dos animais experimentais. Asteriskos mostram diferenças entre experimental e controle e as letras denotam diferenças entre os diferentes tratamentos.

Os resultados mostram que a glicose na hemolinfa dos caranguejos diminui depois de 24 e 96 hs de exposição ao Cu, mas estabiliza depois de 15 dias. Na urina, por outro lado, diminui em 24 h, mas aumenta substancialmente depois de 96 hs e 15 dias, baixando um pouco nesse período. Vale ressaltar que a diminuição em 96 hs na hemolinfa é seguida de um grande aumento de glicose na urina.

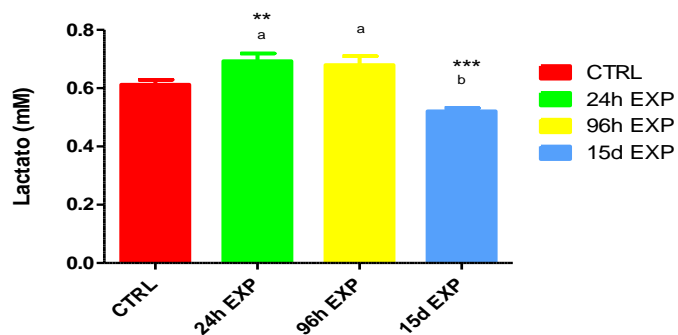


Figura 11: Lactato (mM) na hemolinfa de animais submetidos a CuSO_4 (5mg/L^{-1}) por 24h, 96h e 15dias. O controle negativo (CTRL) são animais retirados dos tanques e a glicose medida e o controle (CTRL) foi submetido às mesmas condições dos animais experimentais. Asteriskos mostram diferenças entre experimental e controle e as letras denotam diferenças entre os diferentes tratamentos.

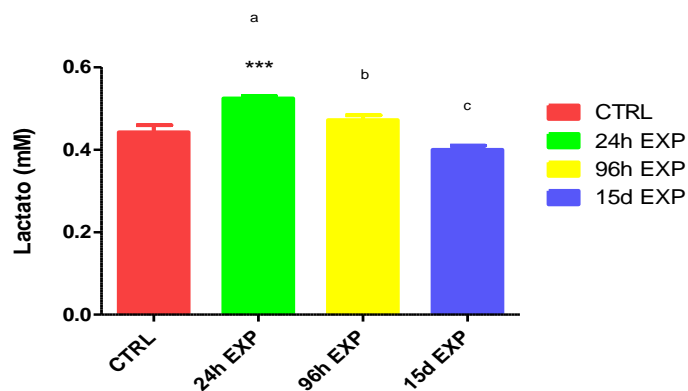


Figura 12: Lactato (mM) na urina de animais submetidos a CuSO_4 (5mg/L^{-1}) por 24h, 96h e 15dias. O controle negativo (CTRL) são animais retirados dos tanques e a glicose medida e o controle (CTRL) foi submetido às mesmas condições dos animais experimentais. Asteriskos mostram diferenças entre experimental e controle e as letras denotam diferenças entre os diferentes tratamentos.

Já o lactato aumenta na hemolinfa dos animais nas primeiras 24 hs de exposição ao Cu, juntamente com o lactato na urina, evidenciando o uso da glicose por via anaeróbica logo após a exposição ao cobre. Porém, o lactato se estabiliza após 96 hs na hemolinfa e na urina.

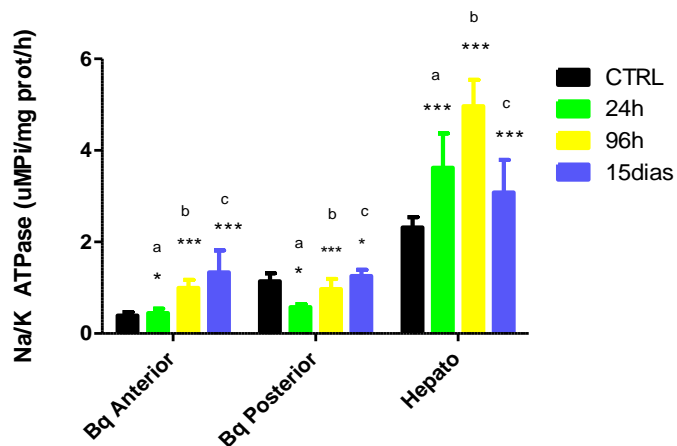


Figura 13: Relação entre a atividade da Na/K-ATPase nos diferentes tecidos dos caranguejos (brânquia anterior, brânquia posterior e hepatopancreas) em animais sem Cu na água (controle), e com Cu a 5 mg/L⁻¹ por 24 h, 96 h e 15 dias.

A atividade da Na/K-ATPase aumenta gradativamente com o aumento da exposição dos animais ao Cu nas brânquias anteriores, como também nas posteriores, com uma queda porém após 24 h. Para o hepatopancreas, a atividade da enzima também aumenta em relação aos animais controle, atingindo um pico após 96 hs e decaindo após 15 dias, porém ainda elevado em relação ao controle. De maneira geral a atividade do transportador não se estabiliza quando os animais são expostos ao Cu.

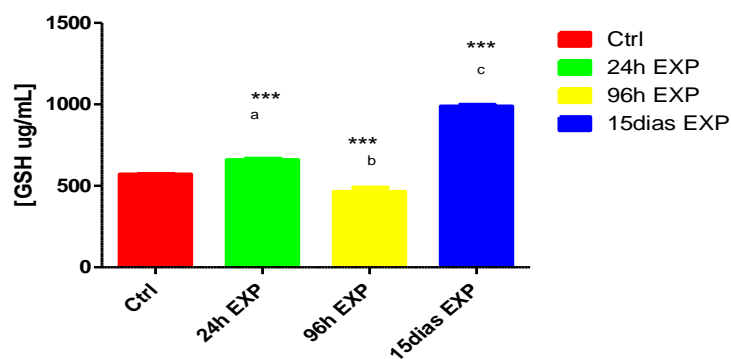


Figura 14: Relação entre a atividade da GSH (ug/mL) no hepatopancreas dos caranguejos em animais sem Cu na água (controle), e com Cu a 5 mg/L⁻¹ por 24 h, 96 h e 15 dias.

A concentração da metalotioneína (GSH) no hepatopâncreas aumenta para animais expostos ao Cu por 24h e 15 dias, e diminui em relação ao controle depois de 96 h de exposição.

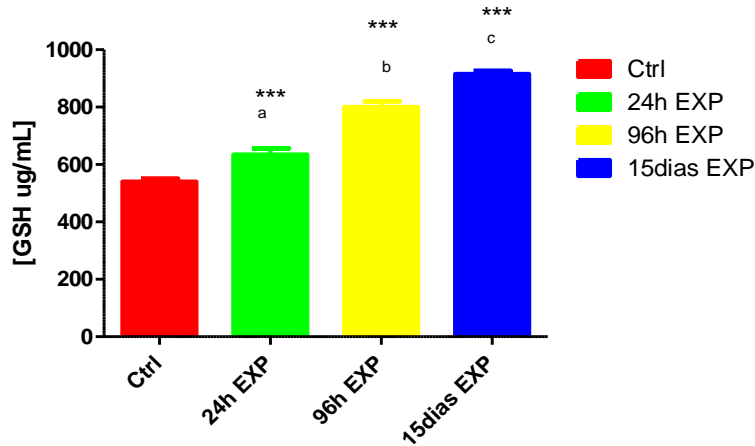


Figura 14: Relação entre a atividade da GSH (ug/mL) nas brânquias anteriores dos caranguejos em animais sem Cu na água (controle), e com Cu a 5 mg/L⁻¹ por 24 h, 96 h e 15 dias.

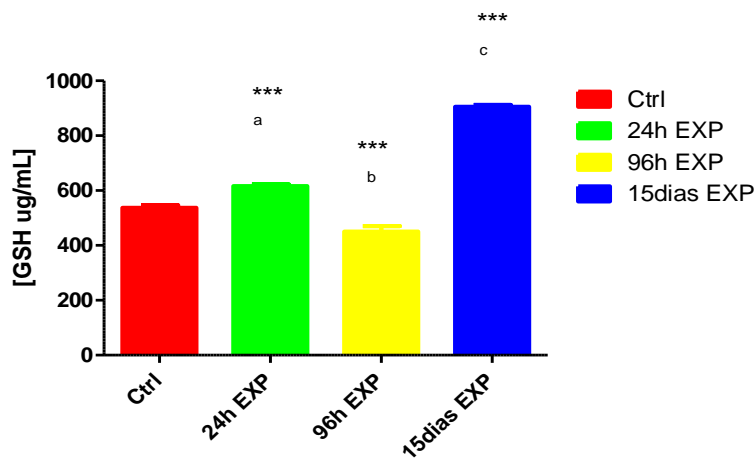


Figura 15: Relação entre a atividade do GSH (ug/mL) nas brânquias posteriores dos caranguejos em animais sem Cu na água (controle), e com Cu a 5 mg/L⁻¹ por 24 h, 96 h e 15 dias.

Para as brânquias anteriores e posteriores, o mesmo padrão é encontrado: aumento da concentração da metalotioneína com o aumento da exposição ao Cu nas brânquias anteriores, porem com uma pequena diminuição após 96 h nas brânquias posteriores, aumentando de novo quando expostos por 15 dias.

Discussão e Conclusões

A cinética do transporte de cobre e do transporte de cobre em interação com o cálcio observada nos resultados (Figuras 1 e 2) pode ser explicada pelo modelo proposto por Chavez-Crooker e colaboradores (2003). Segundo este modelo, que foi feito para células de hepatopancreas, há uma Cu-ATPase que transporta o cobre apicalmente em epitélios de lagostas, sendo estimulada internamente pelo cálcio que entra de forma passiva na célula por canais para cálcio. Segundo Grosell & Wood (2002), a ativação do transporte de cobre pelo cálcio ocorre também do lado citoplasmático do sistema de transporte. Sendo assim, a presença do íon Ca^{2+} na solução contendo Cu^{2+} estimulou a entrada do cobre quando comparado à cinética do transporte em células expostas a uma solução contendo somente cobre, tanto nas brânquias anteriores quanto nas posteriores. Interessantemente, as células das brânquias anteriores, possuindo função exclusivamente respiratória, não apresentaram um transporte de Cu tão significativo entre as curvas controle e experimental. Já as células das brânquias posteriores, com a função de osmorregulação, foram mais sensíveis à adição do cálcio, o que aumentou o transporte de cobre para o meio intracelular.

Para auxiliar na caracterização do transporte de cobre em interação com o cálcio, foram ainda utilizadas drogas que afetam canais e trocadores de membrana tanto apical quanto basolateralmente, como a nifedipina, que inibe canais para cálcio; o vanadato, que atua na inibição da Na/K-ATPase e Ca-ATPase; e o verapamil, que atua no bloqueio de canais lentos para cálcio (WHEATLY *et al.*, 2002b).

Os resultados mostram que a nifedipina inibiu o transporte de cobre tanto nas células anteriores quanto nas posteriores. Isso pode ser explicado tendo como base o mesmo modelo proposto por Chavez-Crooker e colaboradores (2003) para hepatopancreas de lagostas. A nifedipina atua no bloqueio de canais que permitem a entrada passiva de cálcio. Com esses canais bloqueados, os níveis de Ca^{2+} intracelular caem, e a ativação da Cu-ATPase pelo cálcio fica prejudicada. Dessa forma, a nifedipina diminuiu indiretamente a entrada do cobre nas células.

A utilização do vanadato inibiu completamente a entrada do cobre nas células anteriores e posteriores. O modelo de Chavez-Crooker e colaboradores (2003) que descreve o transporte de cobre em epitélio de lagostas também indica que a Cu-ATPase presente nas membranas celulares epiteliais é inibida pelo vanadato. Isso explica nossos resultados (Figuras 5 e 6), que mostram uma queda na concentração de cobre no interior

das células anteriores e posteriores. As células epiteliais possuem mecanismos de entrada e saída dos íons, já que eles devem ser transportados inicialmente do meio externo para dentro das células, e depois de dentro das células para a hemolinfa do animal. Com a inibição da Cu-ATPase pelo vanadato, responsável pelo transporte de cobre para o meio intracelular, houve uma queda na entrada desse íon nas células.

Os resultados observados com a utilização do verapamil (Figuras 7 e 8) não correspondem ao descrito pelo modelo de Chavez-Crooker e colaboradores (2003), já que nas células anteriores o verapamil inibiu de forma pouco significativa a entrada de cobre, e nas células posteriores o que ocorreu foi o estímulo na entrada do Cu^{2+} . O cálcio que entra passivamente por canais sensíveis a verapamil e nifedipina estimula a atividade da Cu-ATPase, e portanto o bloqueio de qualquer um desses canais deveria levar à diminuição da entrada de cobre. No entanto, os canais para cálcio sensíveis a verapamil são lentos, e não devem gerar um fluxo de cálcio significativo para a ativação do transporte de cobre. Esses resultados indicam, portanto, que o estímulo da Cu-ATPase deve provir predominantemente do Ca^{2+} que entra por canais para cálcio sensíveis a nifedipina.

A análise de todos os resultados mostra que o cálcio tem grande papel no movimento e transporte transmembrânico do cobre, estimulando sua entrada na célula. Fica também evidenciado que qualquer inibição em canais para cálcio afeta indiretamente o transporte do cobre. Sendo assim, este trabalho reforça os modelos já propostos para explicar o transporte do cobre em células epiteliais de lagostas e peixes e a influência que o íon cálcio possui nesse processo.

Os parâmetros bioquímicos dos animais expostos ao Cu a 5 mg/L^{-1} por 24, 96 h e 15 dias, apesar de ser uma concentração de Cu alta, mostra que o Cu afeta vários parâmetros osmorregulatórios e metabólicos, como também aumenta a produção da metalotioneína nos diferentes tecidos. Os resultados mostram que existe uma relação inversa entre a concentração de glicose na hemolinfa e na urina, principalmente após 96 h de exposição ao Cu. O perfil do lactato na hemolinfa e urina também se altera. A Na/K ATPase aumenta com o tempo de exposição ao Cu e não se estabiliza em relação ao controle após 15 dias. A metalotioneína aumenta também com a exposição dos animais ao Cu e apresenta valores mais elevados para o hepatopancreas quando comparado às brânquias anteriores e posteriores.

Referências Bibliográficas

AHEARN, G. A. & FRANCO, P. *Ca²⁺ transport pathways in brush border membrane vesicles of crustacean antennal gland*. Am. J. Physiol 264, p. 1206-1213, 1993.

ALCORLO, P., OTERO, M., CREHUET, M., BALTANÁS, A. & MONTES, C. *The use of the red swamp crayfish (Procambarus clarkii, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain)*. Sci. Total Environ. 366, p. 380-90, 2006.

CHAVEZ CROOKER, GARRIDO, P. & AHEARN, G. A. *Copper transport by lobster hepatopancreatic epithelial cells separated by centrifugal elutriation: measurements with the fluorescent dye Phen Green*. J. Exp. Biol. 204, p. 1433-1444, 2002a.

CHAVEZ-CROOKER, P., GARRIDO, N. & AHEARN, G. *Copper transport by lobster (Homarus americanus) hepatopancreatic mitochondria*. J. Exp. Biol. 205, p. 405-13, 2002b.

CHAVEZ-CROOKER, P., POZO, P., CASTRO, H., DICE, M., BOUTET, I., TANGUY, A., MORAGA, D. & AHEARN, G. *Cellular localization of calcium, heavy metals, and metallothionein in lobster (Homarus americanus) hepatopancreas*. Comp. Biochem. Physiol. C 136, p. 213-24, 2003.

FLIK, G., VERBOST, P. M., ATSMAN, W. & LUCU, C. *Calcium transport in the gill plasma membrane of the shore crab Carcinus maenas: Evidence for carriers driven by ATP and Na⁺ -gradient*. J. Exp. Biol. 185, p. 109-123, 1994.

GROSELL, M. & WOOD, C. *Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry*. J. Exp. Biol. 205, p. 1179-88, 2002.

GUNTER, T. E., YULE, D. I., GUNTER, K. K., ELISEEV, R. A. & SALTER, J. S. *Calcium and mitochondria*. Fed. Eur. Biochem. Soc. Letters. 567, p. 96-102, 2004.

LUCU, C. & TOWLE, D. *Na⁽⁺⁾+K⁽⁺⁾-ATPase in gills of aquatic crustacea*. Comp. Biochem. Physiol. A 135, p. 195-214, 2003.

MANDAL, P., MANDAL, A. & AHEARN, G. *Physiological characterization of ⁴⁵Ca²⁺ and ⁶⁵Zn²⁺ transport by lobster hepatopancreatic endoplasmic reticulum*. J. Exp. Zool. A 303, p. 515-26, 2005.

MARTINEZ, C., ALVARES, E., HARRIS, R. & SANTOS, M. *A morphological study on posterior gills of the mangrove crab Ucides cordatus*. Tissue Cell 31, p. 380-9, 1999.

SHINGLES, R., WIMMERS, L. & MCCARTY, R. *Copper transport across pea thylakoid membranes*. Plant Physiol. 135, p. 145-51, 2004.

SÁ, M. G., VALENTI, W. & ZANOTTO, F. *Dietary copper absorption and excretion in three semi-terrestrial grapsoid crabs with different levels of terrestrial adaptation*. Comp. Biochem. Physiol. C 148, p. 112-6, 2008.

SÁ, M. G.; BLOTA-BAPTISTA, B.; Farah, L.; PISANI, V. L.; ZANOTTO, F. P. *Calcium transport and homeostasis in gill cells of a freshwater crab Dilocarcinus pagei*. Journ. Comp. Physiol. B 180, p. 313-321, 2010.

WHEATLY, M. G. *Calcium homeostasis in Crustacea: the evolving role of branchial, renal, digestive and hypodermal epithelia*. J. Exp. Zool. 283, p. 620-640, 1999a.

WHEATLY, M. G., Pence, R. C. & Weil, J. *ATP dependent calcium uptake into basolateral vesicles from transporting epithelia of intermolt crayfish*. Am. J. Physiol. 276, R566-R574, 1999b.

WHEATLY, M. G., HUBBARD, M. G. & CORBERT, A. M. *Physiological characterization of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) in hepatopancreatic and antennal gland basolateral membrane vesicles isolated of the freshwater crayfish Procambarus clarkii*. Comp. Biochem. Physiol. 131A, p. 343-361, 2002a.

WHEATLY, M., ZANOTTO, F. & HUBBARD, M. *Calcium homeostasis in crustaceans: subcellular Ca dynamics*. Comp. Biochem. Physiol. B 132, p. 163-78, 2002b.

ZANOTTO, F. & WHEATLY, M. G. *Calcium balance in crustaceans: nutritional aspects of physiological regulation*. Comp. Biochem. Physiol A 133, p. 645-60, 2002.