



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINE SANTOS

**METABOLISMO TECIDO-ESPECÍFICO DE benzo[a]pireno
NO PEIXE *Prochilodus lineatus*:
UMA ABORDAGEM TEMPORAL**

Londrina
2020

CAROLINE SANTOS

**METABOLISMO TECIDO-ESPECÍFICO DE benzo[a]pireno
NO PEIXE *Prochilodus lineatus*:
UMA ABORDAGEM TEMPORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Claudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S237m Santos, Caroline.

Metabolismo tecido-específico de benzo[a]pireno no peixe *Prochilodus lineatus* : uma abordagem temporal / Caroline Santos. - Londrina, 2020.
105 f. : il.

Orientador: Claudia Bueno dos Reis Martinez.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Ecotoxicologia aquática - Tese. 2. Biotransformação de xenobióticos - Tese. 3. Danos no DNA - Tese. 4. Metabólitos biliares - Tese. I. Martinez, Claudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 575.1

CAROLINE SANTOS

**METABOLISMO TECIDO-ESPECÍFICO DE benzo[a]pireno
NO PEIXE *Prochilodus lineatus*:
UMA ABORDAGEM TEMPORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Bueno dos
Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Marta Margarete Cestari
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Profa. Dra. Luciana Fernandes de Oliveira
Instituto Federal do Paraná - IFPR

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllus Cólus
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de fevereiro de 2020

Dedico este trabalho às primeiras que me ouviram
falar durante horas sobre a Natureza lá fora.
Camila e Clarissa, a vida continua incrível para
além das caixas e das janelas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é a finalização de uma jornada que eu não trilhei sozinha. Todos aqueles que de certa forma compartilharam um momento desse processo tem parte na conclusão dessa etapa. Não existe maneira indireta de ter colaborado ou participação pequena: todos foram importantes.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina por proporcionar crescimento pessoal e desenvolvimento intelectual durante minha formação.

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial a Prof^a. Dra. Silvia Helena Sofia pela atenção enquanto atuava na coordenação do programa e ao Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela pelo trabalho atual como coordenador.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa e apoio financeiro (Código de Financiamento 001). Agradeço também ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE/CAPES) pela concessão da bolsa no exterior.

Agradeço às professoras Dra. Marta Margarete Cestari, Dra. Luciana Fernandes de Oliveira, Dra. Ilce Mara de Syllus Cólus e Dra. Silvia Helena Sofia pela disponibilidade em contribuir e avaliar este trabalho.

Agradeço imensamente minha orientadora Cláudia pela dedicação e cuidado durante toda a minha formação. Desde minha primeira atividade no LEFA até hoje, obrigada por ter acreditado no que eu tinha para oferecer e por todos os ensinamentos. Acredito que poucos tem a sua sensibilidade de compartilhar o conhecimento com tanto significado para a vida. Eu me tornei uma pessoa melhor sob os seus cuidados.

Agradeço à Silvia por ter me inspirado com seu amor pelo que faz. É puro contentamento te ver trabalhar. Obrigada por ter aceitado essa empreitada e por ter permitido a realização desse projeto.

Agradeço a Prof^a Ilce pela disponibilização dos equipamentos para análise de expressão gênica. Agradeço a Lenice pelo incrível comprometimento que demonstrou em cada uma das inúmeras tentativas que fizemos para desvendar os mistérios da amplificação. Obrigada por partilhar seu tempo e conhecimento comigo.

Agradeço ao Prof. Dr. Matt Vijayan pela acolhida durante meu estágio na Universidade de Calgary, pela empolgação com as minhas conquistas e pelos

ensinamentos valiosos. Agradeço ao Dr. Patrick Gauthier pela paciência com o meu inglês e por me ensinar um universo de coisas com muita simplicidade.

Agradeço a família LEFA pelo companheirismo e pelas infinitas boas lembranças. Eu não poderia ter pessoas melhores para compartilhar as alegrias e frustrações da ciência. Obrigada Laura, Carlos e Thais que estão vivendo o mundo lá fora e ficaram no coração. E obrigada Millena, Jes, Angélica, Mari, Duda, Tiago, James, Wagner, Hellen, Laís, Vanessa, Mayra, Kathya, Júlia, Paulo e Ju por toda ajuda nos experimentos, por tudo o que vocês me ensinaram e pela presença marcante em cada dia. Agregados LEFA: obrigada Mari Terra e Lucas Medri!

Para os amigos que pude cultivar, um agradecimento todo especial pela companhia incrível e pela vida linda que vocês me permitiram a viver. Obrigada Tiago, Angélica, Millena, Jes, Laís e Hellen, vocês são pessoas maravilhosas que merecem uma vida incrível.

Agradeço à Lu que me ensinou e ainda ensina pacientemente o que sabe e enriquece meus dias com sua presença. Obrigada pela alegria da sua amizade.

Agradeço às meninas da faculdade Vanessa, Carol Loira, Denise e Guta que me trouxeram alegrias e apoio demais para serem explicados. Agradeço à minha best Nadjha pela honra de ter a sua amizade e pela vida que pudemos viver. Meus dias não teriam tanta intensidade e riqueza sem você, Nadjha. Obrigada pelo amor que você sempre me dedicou e pela confiança naquilo que eu posso realizar.

Agradeço intensamente à minha família. É por eles que estou viva, saudável e, sobretudo, completa. Meus pais me ensinaram a andar, dançar, falar, ouvir e aprender. Agradeço ao meu pai, que me ensinou a ser independente, bom e livre. Agradeço à minha mãe, sempre tão forte e amorosa, por me acompanhar com seus olhos preocupados e lindos. Agradeço às minhas irmãs, por me ensinarem a ensinar, a cuidar e a proteger. E obrigada à vovó Maria pelo carinho. Obrigada a todos vocês por me aguentarem falando tanta bobagem, ensinando tanta loucura e rindo tanto à toa. Eu não poderia ser mais feliz com vocês.

Agradeço àquele dia em que a rampa era bem íngreme e a música dançava em roda. Porque assim, de repente, a gente se encontrou. Obrigada Lucas por fazer eu me sentir em casa. Obrigada pelo companheirismo e pelas conversas que podem durar a vida inteira. Obrigada por acreditar tanto em mim.

“Enjoy your achievements as well as your plans” (Max Ehrmann, *Desiderata*, 1952).

"Uma vez, há muitos, muitos anos, um menino olhou o mundo com olhos interrogadores. Tudo era mistério em torno dele. Era numa casa grande. O arvoredo que a cercava amanhecia sempre cheio de cantos de pássaros. O mundo não terminava ali no fim daquela rua quieta, que tinha um cego que tocava concertina, um cachorro sem dono que se refestelava ao sol, um português que pelas tardinhas se sentava à frente de sua casa e desejava boa tarde a toda a gente. Não. O mundo ia além. Além do horizonte havia mais terras, e campos, e montanhas, e cidades, e rios e mares sem fim. Dava em nós vontade de correr mundo, andar nos trens que atravessavam as terras, nos vapores que cortam os mares. Nos olhos do menino havia uma saudade impossível, a saudade de uma terra nunca vista."

Érico Veríssimo – Clarissa

SANTOS, Caroline. **Metabolismo tecido-específico de benzo[a]pireno no peixe *Prochilodus lineatus***: uma abordagem temporal. 2020. 105 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

A capacidade de biotransformação é o resultado de uma série de respostas órgão-específicas que atuam de forma coordenada na detoxificação do organismo e podem variar dependendo da espécie afetada. O presente trabalho analisou os mecanismos envolvidos na biotransformação de xenobióticos em diferentes órgãos do teleosteo *Prochilodus lineatus*, a fim de avaliar a variação temporal destes parâmetros após 6, 24 e 96 h da indução por injeção de benzo[a]pireno (B[a]P). Apesar dos diferentes tempos de resposta, brânquia, fígado, cérebro e rim apresentaram aumento na transcrição do gene *cyp1a* em ao menos dois períodos experimentais. A ativação da 7-etoxiresorufina O-deetilase (EROD) nas brânquias foi mais lenta do que nos outros órgãos (24 h), porém apresentou a maior amplitude. Apesar disso, as brânquias não se mostraram uma via importante para efluxo de xenobióticos, pois não foi observada alteração na atividade do mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR). Além disso, a ocorrência de danos genotóxicos perduram por mais tempo nas brânquias. O fígado apresentou alto valor basal da EROD e rápida indução na atividade da enzima (6 h), além de uma prolongada atividade da MXR e transporte de B[a]P e seus metabólitos para a vesícula biliar. O fígado também apresentou uma alta capacidade de recuperação de danos no DNA quando a concentração de agentes genotóxicos diminuiu pela atividade da MXR. No cérebro foi observado um aumento crescente na indução da transcrição do *cyp1a* ao longo do tempo e a atividade da EROD só aumentou após 24 h. Em contrapartida, a atividade da MXR foi prontamente induzida para diminuir a concentração do xenobiótico no meio intracelular. Entretanto, a MXR não impediu a ocorrência de danos no DNA nas células cerebrais, mas pode ter favorecido sua diminuição ao longo do tempo. A atividade da EROD no rim permaneceu aumentada nos três tempos experimentais, provavelmente pela participação do órgão na excreção de metabólitos da biotransformação. No tempo de maior indução da MXR (24 h), não foram observados danos no DNA das células renais. Porém, a produção de metabólitos da biotransformação por todos os órgãos pode ter acarretado a sobrecarga da MXR renal, como indicado por sua redução em 96 h. O sangue participa da manutenção da integridade do organismo por meio da distribuição do xenobiótico para os diferentes órgãos e encaminhamento dos metabólitos para excreção. A presença de danos no DNA dos eritrócitos em 6 h demonstrou a distribuição do xenobiótico através do sangue, assim como as pequenas oscilações nas classes de danos, observadas nos eritrócitos em 96 h, pode estar relacionada com a diminuição da MXR no rim neste mesmo tempo experimental. No futuro, estudos que caracterizem a expressão de transportadores envolvido na MXR e as proteínas reparo do DNA podem acrescentar informações importantes para a compreensão dos mecanismos moleculares implicados na detoxificação de *P. lineatus*.

Palavras-chave: biotransformação; metabólitos biliares; ensaio do cometa; acúmulo de rodamina.

SANTOS, Caroline. **Benzo[a]pyrene tissue-specific metabolism in the fish *Prochilodus lineatus***: a temporal approach. 2020. 105 p. Thesis (PhD Thesis in Genetics and Molecular Biology) – Londrina State University, Londrina.

ABSTRACT

The capacity for biotransformation is the result of a series of organ-specific responses that act in a coordinated way in the detoxification of the organism and may vary depending on the affected species. The current work analyzed the mechanisms involved in the biotransformation of xenobiotics in different organs of the teleost *Prochilodus lineatus*, in order to evaluate the temporal variation in these parameters at 6, 24, and 96 h after induction with an injection of benzo[a]pyrene (B[a]P). Despite the different response times, the gills, liver, brain, and kidney presented an increase in the transcription of the *cyp1a* gene in at least two experimental periods. The activation of 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) was slower in the gills than in the other organs (24 h) but presented the greatest amplitude. Despite this, the gills were not shown to be an important pathway for xenobiotic efflux, as no alteration was observed in the activity of the multixenobiotic resistance mechanism (MXR). Furthermore, the occurrence of genotoxic damage lasted longer in the gills. The liver showed a high baseline EROD value and rapid induction of enzyme activity (6 h), in addition to prolonged MXR activity and transport of B[a]P and its metabolites to the gallbladder. The liver also demonstrated high ability to recover DNA damage when the concentration of genotoxic agents decreased due to MXR activity. In the brain, an increase in the induction of *cyp1a* transcription was observed over time, and the activity of EROD only increased after 24 h. In contrast, MXR activity was quickly induced to decrease the concentration of xenobiotics in the intracellular environment. MXR did not prevent DNA damage to the brain cells but may have stimulated its decrease over time. EROD activity in the kidney remained increased in the three experimental times, probably due to the participation of the organ in the excretion of biotransformation metabolites. At the time of greatest MXR induction (24 h), no damage in the DNA of renal cells was observed. However, the production of biotransformation metabolites by all organs may have led to renal MXR overload, as indicated by its reduction in 96 h. Blood participates in maintaining the integrity of the organism by distributing the xenobiotic to the different organs and directing the metabolites for excretion. The presence of erythrocyte DNA damage in 6 h demonstrated the distribution of the xenobiotic through the blood, as well as the small oscillations in the classes of damage, observed in erythrocytes in 96 h, may be related to the decrease in MXR in the kidney in the same experimental time. Future studies that characterize the expression of transporters involved in MXR and DNA repair proteins may add important information for understanding the molecular mechanisms related to the detoxification of *P. lineatus*.

Keywords: biotransformation; bile metabolites; comet assay; rhodamine accumulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

·OH	– Radical hidroxil
AhR	– Receptor intracelular aril hidrocarbonetos
ARNT	– Translocador nuclear de aril hidrocarbonetos
B[a]P	– Benzo[a]pireno
BER	– Reparo do DNA por excisão de base
BPDEs	– Dióis epóxidos
BSA	– Salbumina de soro bovino
CDNB	– 1-cloro- 2,4-dinitrobenzeno
CEUA	– Comitê de ética no uso de animais
CYPs	– Enzimas da superfamília do citocromo P450
CYP1A	– Enzima da superfamília do citocromo P450
<i>cyp1a</i>	– Gene que codifica para a enzima CYP1A
DNA	– ácido desoxirribonucleico
DTNB	– ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoíoco
EROD	– ethoxyresorufina-O-deetilase
GSH	– Glutationa
GST	– Glutationa S-transferases
Hb	– Conteúdo de hemoglobina no sangue total
Hct	– Porcentagem de células sanguíneas em relação ao plasma
HPAs	– Hidrocarbonetos poliaromáticos
HSP 90	– Proteína de choque térmico
LPO	– Lipoperoxidação
MDA	– Malondialdeído
MDR	– Resistência à multidroga
mRNA	– RNA mensageiro
MXR	– Resistência à multixenobióticos
NCBI	– <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NER	– Reparo do DNA por excisão de nucleotídeo
O ₂ ^{·-}	– Ânion superóxido
PAHs	– <i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
PCBs	– Bifenilas policloradas

PCDDs	– Dioxinas policloradas
PCDFs	– Furanos
Proteína ABC	– Transportador de membrana <i>ATP-binding cassette</i>
RBC	– Número de células vermelhas por mm ³ de sangue
SULTs	– PAPS-sulfotransferases
Tbars	– Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico
UGTs	– UDP-glicoronosiltransferases
XREs	– Elementos de resposta à multixenobióticos

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese foi organizada para atender às normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina. A tese contém uma análise órgão-específica de diferentes biomarcadores na atividade de enzimas e mecanismos envolvidos na biotransformação de xenobióticos do peixe Neotropical *Prochilodus lineatus*. No capítulo I encontram-se a Introdução Geral, a Fundamentação Teórica e os Objetivos traçados para o projeto da tese. O capítulo II contém o manuscrito “Biotransformation mechanism in the fish *Prochilodus lineatus*: an organ-specific approach to *cyp1a* gene expression and biochemical activity”, submetido ao periódico *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Fator de Impacto: 3,061). O capítulo III contém o manuscrito em construção “Mecanismo de resistência a multixenobióticos: características órgão-específicas no peixe *Prochilodus lineatus* e seu papel na proteção contra agentes genotóxicos”. Pretende-se submeter esse manuscrito ao periódico *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* (Fator de Impacto: 2,697). No capítulo IV encontram-se as conclusões geradas a partir dos dados coletados. A tese é finalizada com as Informações Adicionais, onde são apresentadas algumas informações complementares.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	15
1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA.....	17
2.2	BIOMARCADORES	19
2.3	METABOLISMO CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO À XENOBIÓTICOS.....	21
2.4	EFEITOS TÓXICOS DO METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS	28
2.5	BENZO[A]PIRENO	29
2.6	MODELO EXPERIMENTAL	31
	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
	REFERÊNCIAS	35
	 CAPÍTULO 2	44
	Biotransformation mechanism in the fish <i>Prochilodus lineatus</i>: an organ-specific approach to cyp1a gene expression and biochemical activity	44
	highlights	45
	abstract	45
1	INTRODUCTION	46
2	MATERIAL AND METHODS	48
2.1	EXPERIMENTAL PROCEDURES	48
2.2	ISOLATION OF TOTAL RNA AND CDNA SYNTHESIS	49
2.3	QPCR REACTIONS	50
2.4	BIOCHEMICAL BIOMARKERS.....	50
2.5	B[A]P CONCENTRATION IN BILE	51
2.6	STATISTICAL ANALYSIS	51
3	RESULTS	51
3.1	EXPRESSION OF CYP1A	51
3.2	EROD ACTIVITY.....	53
3.3	GST ACTIVITY.....	54

3.4	NONPROTEIN THIOLS	54
3.5	LIPID PEROXIDATION	55
3.6	CONCENTRATION OF B[A]P IN BILE.....	55
4	DISCUSSION	57
	CONCLUSIONS	63
	ACKNOWLEDGMENTS	63
	REFERENCES	63
	 CAPÍTULO 3	 71
	Mecanismo de resistência a multixenobióticos: características órgão-específicas no peixe Prochilodus lineatus e seu papel na proteção contra agentes genotóxicos	71
	Resumo	72
1	INTRODUÇÃO	73
2	MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	75
2.2	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	76
2.3	ATIVIDADE DA MXR – ENSAIO DO ACÚMULO DE RODAMINA B	77
2.4	DANOS NO DNA	77
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	78
3	RESULTADOS	78
3.1	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	78
3.2	ATIVIDADE DA MXR.....	78
3.3	DANOS NO DNA	79
4	DISCUSSÃO	83
	CONCLUSÃO	89
	AGRADECIMENTOS	90
	REFERÊNCIAS	90
	 CAPÍTULO IV	 96
	CONCLUSÕES	96
	 INFORMAÇÕES ADICIONAIS	 98

REFERÊNCIAS.....101

ANEXOS102

Anexo I: Aprovação dos procedimentos com animais pela
Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de
Londrina.....103

Anexo II: Carta de conclusão do Doutorado Sanduíche enviada à
CAPES pelo prof. dr. Mathilakath Vijayan104

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O impacto biológico da contaminação ambiental é resultado de uma cascata de eventos que varia dependendo da natureza química do contaminante e da espécie exposta (ASHAUER; JAGER, 2018; PIÑA; CASADO; QUIRÓS, 2007). Desta forma, os testes de toxicidade que utilizam espécies exóticas não representam os mecanismos de adaptação da biota aquática brasileira (BIELEN *et al.*, 2016; FREITAS; ROCHA, 2011; MARTINS; BIANCHINI, 2011; ZHANG *et al.*, 2019), pois a resposta dos biomarcadores apresentam variações espécie-específicas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Além disso, os mecanismos de resposta a um xenobiótico são diferencialmente expressos em diferentes órgãos do organismo (GLISIC *et al.*, 2015; LONČAR *et al.*, 2010; YUAN *et al.*, 2013). Assim, a resistência ou sensibilidade de uma determinada espécie à contaminação local pode estar associada à capacidade de modulação de resposta e a duração do efeito em cada órgão (LEE; YOON; LEE, 2015; LEGGIERI *et al.*, 2019). Desta forma, a análise de vários órgãos faz-se necessária para entender os mecanismos de resposta do organismo como um todo (LEE; YOON; LEE, 2015).

A avaliação dos mecanismos de biotransformação em peixes tem associado a transcrição de genes que codificam proteínas ou enzimas bem estabelecidas com os biomarcadores bioquímicos, assumindo-se que alterações nos parâmetros bioquímicos são paralelas às mudanças na expressão de seus genes correspondentes (LI *et al.*, 2016; MORAES *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2018). Porém, nem sempre isso ocorre e a compreensão dos processos envolvidos nas respostas celulares necessita de abordagem integrada de biomarcadores (JANZ, 2013) uma vez que a entrada de um xenobiótico pode alterar o metabolismo celular no nível transcricional e pós-transcricional (BURGOS-ACEVES *et al.*, 2018; KASSAHN *et al.*, 2007).

O peixe Neotropical *Prochilodus lineatus* (Valencienes, 1836) vem sendo utilizado em estudos ecotoxicológicos na América do Sul e já demonstrou uma elevada sensibilidade à uma série de contaminantes orgânicos (FIORELINI PEREIRA *et al.*, 2017; PÉREZ *et al.*, 2018; POLETTA *et al.*, 2013 ;SANTOS-SILVA; MONTAGNER; MARTINEZ, 2018; SANTOS *et al.*, 2018; SIMONATO *et al.*, 2011;

VIEIRA; MARTINEZ, 2018). Além disso, as diferenças na capacidade de indução do mecanismo de biotransformação foram demonstradas no fígado e nas brânquias de *P. lineatus*, bem como a dinâmica na indução de danos no DNA desses órgãos (SANTOS *et al.*, 2018). Porém, outros órgãos podem ser importantes na cinética de resposta do organismo exposto à um xenobiótico, que podem contribuir para a metabolização e excreção dos compostos ao longo do tempo. Como a manutenção da integridade do organismo é resultado de uma série de respostas metabólicas, o presente trabalho propõe a análise órgão-específica dos mecanismos envolvidos na biotransformação de xenobióticos em *P. lineatus*, bem como os possíveis danos gerados nesse processo, a fim de avaliar a variação temporal destes parâmetros após a indução por benzo[a]pireno. O benzo[a]pireno é um hidrocarboneto poliaromático considerado um importante indutor das enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos, no sistema de defesa antioxidante e causar danos em diversos organismos, inclusive os peixes (BUDINSKY *et al.*, 2014; CHIARO *et al.*, 2007; JURICEK; COUMOUL, 2018; LARIGOT *et al.*, 2018).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Ecotoxicologia Aquática

A água é um composto essencial na manutenção da vida na Terra e recobre aproximadamente dois terços da superfície do planeta. Os recursos naturais dos sistemas aquáticos são utilizados constantemente para atividades humanas, desde alimentação e recreação, até saneamento, agricultura e produção industrial. Essas atividades provocam um forte impacto nos ecossistemas aquáticos, seja pela exploração insustentável dos recursos aquáticos, ou pelas modificações na dinâmica das comunidades e geração de resíduos. O aumento populacional e a consequente urbanização, industrialização e produção agrícola colocam em risco o abastecimento de água potável para as populações humanas e provocam impactos negativos nos organismos marinhos e de água doce. Deste modo, as espécies aquáticas estão constantemente expostas a uma série de compostos químicos com potencial deletério em concentrações subletais (HÄDER *et al.*, 2020; MUSHTAQ *et al.*, 2020).

Neste contexto, a Ecotoxicologia Aquática tem por objetivo avaliar a qualidade ambiental considerando as características do ambiente, a quantidade e a biodisponibilidade dos contaminantes, a interação com a biota e os efeitos nos organismos, populações e/ou comunidades. Os estudos ecotoxicológicos fornecem informações sobre a interação dos contaminantes com os componentes da biosfera e auxiliam a delinear critérios confiáveis de qualidade ambiental que embasam a formulação de dispositivos legais e gerenciais que garantam a proteção e sustentabilidade das populações e comunidades aquáticas (JANZ, 2013).

Uma série de fatores influenciam as alterações biológicas que resultam da contaminação ambiental, o que exige a integração de diversas áreas do conhecimento para a compreensão dos efeitos dos contaminantes nos organismos. Esses efeitos podem ser estudados em diferentes níveis de organização biológica, e incluem alterações metabólicas e/ou processos reprodutivos, comportamentais ou susceptibilidade a doenças (VELDHOEN; IKONOMOU; HELBING, 2012). Em exposições crônicas, os efeitos individuais podem culminar em alterações na abundância, diversidade e condição fisiológica do grupo, provocando mudanças populacionais ou de comunidades (CLEMENTS; HICKEY; KIDD, 2012), como mostra a Figura 1.1. Assim, a observação de alterações no nível subindividual, antes que ocorram danos em níveis de organização biológica superiores, são importantes

na preposição de estratégias corretivas para que os danos não atinjam proporções ambientais e ecológicas irreversíveis (CAJARAVILLE *et al.*, 2000).

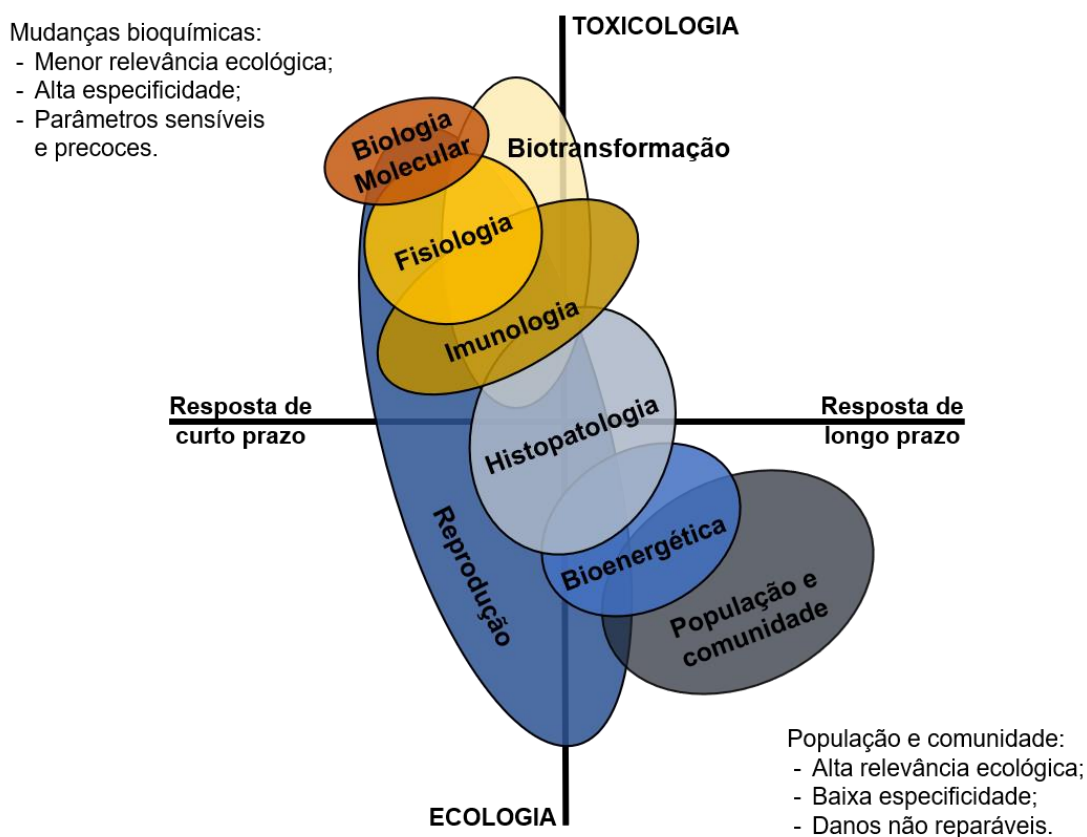


Figura 1.1 - Respostas biológicas em diferentes níveis de organização biológica em relação a presença e/ou efeitos de estressores ambientais, incluindo contaminantes químicos. Traduzido e adaptado de Amiard-Triquet; Amiard; Mouneyrac, (2015).

Entre os organismos aquáticos utilizados em estudos ecotoxicológicos, os peixes são considerados excelentes modelos biológicos no monitoramento ambiental e avaliações de toxicidade (KARR, 1981), uma vez que podem ser encontrados na maioria dos ambientes aquáticos onde desempenham um papel essencial na cadeia alimentar. Além disso, podem ser sensíveis a uma série de contaminantes ambientais pois permanecem com o corpo todo em contato com os compostos dissolvidos na água (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A escolha correta dos métodos de avaliação é essencial para a realização de testes ecotoxicológicos confiáveis. Uma estratégia para estabelecer a relação do efeito biológico e a biodisponibilidade de um dado composto são os testes de toxicidade, desenvolvidos para determinar a toxicidade de uma substância ou material avaliando o seu efeito sobre os organismos vivos, além de estabelecer as concentrações e a duração da exposição que produzem um grau de efeito biológico

e prever os riscos ambientais (HODSON; ADAMS; BROWN, 2019; TAYLOR; SCROGGINS, 2013). Porém, as espécies podem apresentar sensibilidades diferentes aos contaminantes, o que torna importante testar diferentes espécies para obter um amplo espectro de sensibilidade da comunidade local (MARTINS; BIANCHINI, 2011). De maneira geral, a sensibilidade das espécies nativas, bem como as condições físico-químicas locais, refletem os impactos específicos na biota local e os mecanismos de adaptação das espécies (BIELEN *et al.*, 2016; FREITAS; ROCHA, 2011; ZHANG *et al.*, 2019). Desta forma, a avaliação da sensibilidade e do mecanismo de toxicidade dos contaminantes em espécies nativas proporciona maior realismo e relevância ecológica no delineamento de critérios significativos de qualidade ambiental e garante a proteção de espécies sensíveis dentro dos ecossistemas (FURLEY *et al.*, 2018).

2.2 Biomarcadores

Os efeitos biológicos provocados pelos contaminantes ambientais são avaliados rotineiramente através de vários biomarcadores que refletem a indução de sistemas celulares específicos ou o início de alterações estruturais. Em ecotoxicologia, os biomarcadores são definidos como biomarcadores variações induzidas por contaminantes em componentes moleculares ou celulares, processos, estruturas ou funções, que podem ser mensuradas em sistemas biológicos ou amostras (DEPLEDGE; AAGAARD; GYORKOST, 1995). A utilização de biomarcadores tem desempenhado um papel significativo nos estudos de Ecotoxicologia Aquática devido ao seu potencial de antecipar prejuízos em níveis de organização biológica superiores, permitindo uma avaliação dos potenciais riscos para populações, comunidades ou ecossistemas de maneira preventiva (HOOK; GALLAGHER; BATLEY, 2014; MOUNEYRAC; AMIARD-TRIQUET, 2013), pois são capazes de demonstrar pequenas variações individuais antes da ocorrência de danos irreversíveis ao ecossistema (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os biomarcadores constituem importantes ferramentas para monitorar a qualidade do ambiente aquático e têm sido empregados como métodos de avaliação da qualidade ambiental em diversos países, como o “*Water Framework Directive*”, que propõe uma abordagem integrada na avaliação da qualidade das águas superficiais na União Europeia com base na utilização de índices biológicos (WERNERSSON *et al.*, 2015).

O uso de biomarcadores moleculares e celulares apresenta a vantagem de identificar respostas subletais de aparecimento precoce que são preditivas de outros efeitos com o aumento da concentração ou da duração de exposição (BURGOS-ACEVES *et al.*, 2018; JANZ, 2013). Este aviso antecipado pode ser usado de uma maneira preventiva, permitindo que estratégias corretivas possam ser desenvolvidas (CAJARAVILLE *et al.*, 2000; HOOK; GALLAGHER; BATLEY, 2014). Um grande número de biomarcadores tem sido propostos para avaliar a exposição de peixes aos contaminantes ambientais (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Porém, a resposta observada pode variar amplamente dependendo da espécie de peixe e suas características ecológicas (LEE; YOON; LEE, 2015; LOGAN, 2007). Desta forma, a capacidade de indução de resposta do organismo e está diretamente associada às características ecológicas da espécie e pode afetar a sua distribuição nos ambientes impactados (ASSEF; DI PRINZIO; HORAK, 2019; MACÊDO *et al.*, 2019).

No entanto, nem sempre um biomarcador pode refletir o estado de saúde dos indivíduos e elucidar as respostas adaptativas de uma espécie às condições ambientais. Atualmente, já está bem estabelecida a necessidade de abordagens multidisciplinares a fim de esclarecer a ligação entre a presença de contaminantes e seus impactos tóxicos nos organismos. Neste contexto, a utilização de biomarcadores de alerta precoce representativos dos efeitos biológicos dos contaminantes em organismos tem crescido significativamente ao longo das últimas décadas (BURGOS-ACEVES *et al.*, 2018; GONZALEZ; PIERRON, 2015). Uma vez que os mecanismos dos efeitos nos organismos originam-se com as interações dos compostos tóxicos com macromoléculas celulares (JANZ, 2013) e os efeitos em níveis hierárquicos elevados são precedidos por alterações precoces no nível genômico, o uso de biomarcadores moleculares apresenta uma alta sensibilidade na detecção das respostas a um agente estressor (BURGOS-ACEVES *et al.*, 2018; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A genômica (estudo em larga escala do genoma de um organismo), a proteômica (o estudo do proteoma), a metabolômica (o estudo abrangente e quantitativo do metaboloma) e, de forma especial, a transcriptômica (o estudo do transcriptoma) têm sido descritas como uma forma para decifrar os mecanismos biológicos de resposta frente às mudanças ambientais. Neste contexto, o termo Ecotoxicogenômica foi proposto para descrever um campo híbrido resultante da

combinação da ecologia, toxicologia (incluindo toxicologia ambiental) e as ômicas, o que permite analisar o mecanismo molecular de ação e toxicidade dos compostos de forma abrangente e integrar esses resultados com os de outros ensaios nos demais níveis de organização biológica, como celular, tecidual, indivíduo e populacional (BURGOS-ACEVES *et al.*, 2018; HOOK; GALLAGHER; BATLEY, 2014; MARTYNIUK; SIMMONS, 2016; OSACHOFF; AGGELEN, 2013; SNAPE *et al.*, 2004). Tais informações podem elucidar perfis de resposta altamente sensíveis e, através do conhecimento dos caminhos biológicos afetados, fornecer informações sobre mecanismo de ação dos contaminantes (VELDHOEN; IKONOMOU; HELBING, 2012).

Dentro do campo da transcriptômica, os perfis de expressão gênica representam o primeiro nível de integração entre fatores ambientais e o genoma. Assim, a análise de alterações da expressão gênica é uma ferramenta importante para diagnosticar os principais fatores de estresse em populações naturais e analisar os mecanismos de respostas correspondentes (BURGOS-ACEVES *et al.*, 2018; MARTYNIUK; SIMMONS, 2016; SNAPE *et al.*, 2004). Um método dinâmico para avaliação da expressão gênica, por meio da quantificação de mRNA é a RT-qPCR (transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa), considerada eficaz e adaptável para uso de uma pequena amostra não-letal (VELDHOEN; IKONOMOU; HELBING, 2012) e permite analisar a expressão gênica de um pequeno número de genes em milhares de amostras (KUMAR; DENSLOW, 2016). A maioria dos genes estudados para uso como biomarcador estão relacionados aos genes cujo mRNA codifica proteínas, à exemplo de enzimas, usadas como biomarcadores bioquímicos, admitindo-se que as possíveis alterações nos parâmetros bioquímicos estão paralelamente relacionadas com a expressão de seus genes correspondentes. Na maioria, mas não todos os casos, os dois tipos de biomarcadores estão correlacionados (REGOLI *et al.*, 2011).

2.3 Metabolismo Celular após Exposição à Xenobióticos

A absorção de xenobióticos pelos peixes pode ocorrer em todas as células epiteliais que estão em contato com a água e os alimentos, mas a maior taxa de absorção ocorre nos epitélios respiratórios e gastrintestinais devido às características dos tecidos que favorecem uma rápida absorção como uma grande área de superfície, uma distância de difusão curta, e alta perfusão sanguínea

(TIERNEY *et al.*, 2013). Porém, essas características dos tecidos podem variar muito entre as diferentes espécies de peixes, o que influencia na taxa de acúmulo do xenobiótico no organismo e nas respostas fisiológicas subsequentes (COSTA *et al.*, 2011; RIMAYI; CHIMUKA, 2019).

A partir da entrada do xenobiótico ocorre a sua distribuição através do sistema circulatório para os demais órgãos do organismo. Os compostos hidrofóbicos não se dissolvem facilmente no plasma e se associam a outros componentes do sangue, principalmente proteínas plasmáticas, mas também ao colesterol, triglicerídeos e até mesmo membranas celulares (TIERNEY *et al.*, 2013). A circulação sanguínea pode desempenhar um papel determinante na resposta integrada dos mecanismos de resposta do organismo através da distribuição do xenobiótico a diferentes órgãos (LOGAN, 2007; SANTOS *et al.*, 2018), assim como auxiliar na excreção do composto pelos órgãos especializados (PRITCHARD; BEND; AUGUSTINE, 1984; WRIGHT; DANTZLER, 2004).

Os xenobióticos entram nas células por diversas vias que incluem simples difusão passiva, difusão facilitada, canais de membrana, transporte ativo e endocitose. O acúmulo dos xenobióticos nos tecidos dos peixes depende do equilíbrio entre as taxas de absorção e eliminação (TIERNEY *et al.*, 2013), como demonstrado na Figura 1.2. A maioria das espécies de peixes possui sistemas enzimáticos que metabolizam os xenobióticos orgânicos e a habilidade de indução desse metabolismo influencia no padrão de acumulação e efeito do xenobiótico entre espécies de peixes (LOGAN, 2007).

Desta forma, o impacto dos contaminantes nos organismos é resultado de uma série de eventos e a resposta biológica varia dependendo do contaminante e da espécie afetada (LOGAN, 2007). Como resultado da exposição à um xenobiótico, as células reajustam seu metabolismo a fim de minimizar os danos. Geralmente, alguma alteração na expressão gênica ocorre como resultado direto ou indireto da exposição a um composto tóxico (PIÑA; CASADO; QUIRÓS, 2007; SNAPE *et al.*, 2004).

Assim, a entrada de um xenobiótico ou o aumento de compostos endógenos no meio intracelular podem modular o metabolismo celular no nível transcricional e pós-transcricional, e as mudanças na abundância de transcritos relacionados à detoxificação de xenobióticos estão associadas às respostas ao estresse ambiental (BURGOS-ACEVES *et al.*, 2018; KASSAHN *et al.*, 2007). A

expressão destes genes pode contribuir para a adaptação dos indivíduos aos ambientes alterados, já que a plasticidade na expressão gênica é um mecanismo de sobrevivência para muitos organismos que encontram variações potencialmente deletérias nas condições ambientais (KASSAHN *et al.*, 2007; PETITJEAN *et al.*, 2019).

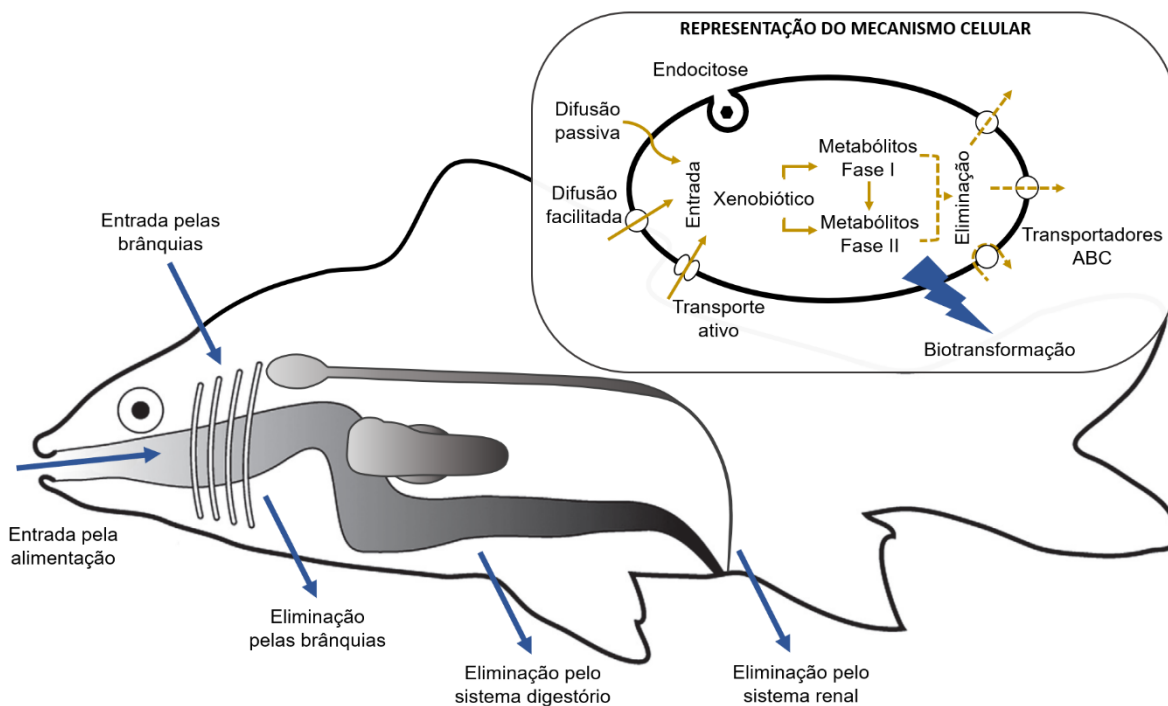


Figura 1.2 - Entrada, biotransformação e eliminação de xenobióticos em peixes. Setas azuis indicam as rotas do organismo; setas amarelas indicam rotas celulares; setas tracejadas representam rotas de efluxo celular; raio azul indica metabolismo celular de xenobióticos que pode ocorrer em diversas células do organismo. Adaptado de Tierney *et al.*, (2013).

Em peixes, assim como em outros vertebrados, a exposição aos xenobióticos orgânicos resulta na indução de sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo de xenobióticos. A biotransformação consiste num processo celular enzimático que altera a molécula dos xenobióticos lipofílicos para metabólitos mais hidrofílicos, de maior afinidade com o sistema de excreção, e tem papel importante na metabolização destes compostos. Muitos xenobióticos importantes são lipofílicos e entram nas células com facilidade através da membrana celular, porém nem sempre ocorre a diminuição da sua toxicidade durante a biotransformação e o metabólito gerado pode ser mais tóxico que o composto original (TIERNEY *et al.*, 2013; VAN DER OOST *et al.*, 2003). A biotransformação pode ser dividida em três fases, cada uma com a participação de proteínas específicas.

A fase I de biotransformação é considerada a principal etapa na metabolização dos xenobióticos em peixes. Durante essa fase, são fornecidos

grupos funcionais polares à molécula do xenobiótico a fim de aumentar a sua solubilidade em água. Estão envolvidas na fase I principalmente reações de oxidação e redução, catalisadas principalmente pelas enzimas pertencentes à superfamília do citocromo P450 (CYP) (SCHLENK *et al.*, 2008; TIERNEY *et al.*, 2013). As CYPs constituem uma superfamília de proteínas contendo um grupo heme na sua estrutura e estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático e na membrana interna das mitocôndrias (TIERNEY *et al.*, 2013). Essas enzimas são encontradas em animais, plantas e microrganismos (SCHLENK *et al.*, 2008), sendo que várias formas de CYP foram detectadas em diversas espécies de peixes marinhos e de água doce (UNO; ISHIZUKA; ITAKURA, 2012). Em estudos com peixes a família de CYP mais estudada é a CYP1A, sendo que expressão do gene *cyp1a* e a atividade 7-etoxiresorufina O-deetilase (EROD) são frequentemente utilizados como biomarcadores de exposição à compostos orgânicos (DOERING *et al.*, 2012; KOGLIN *et al.*, 2016). A reação de oxidação total de enzimas CYP e a reação da EROD está demonstrada na Figura 1.3 (A e B, respectivamente).

Uma das vias de indução da fase I inicia-se pela transcrição do gene *cyp1a* e outros genes do complexo P450 através da ligação do xenobiótico a um receptor aril hidrocarboneto (AhR). Este receptor é um fator de transcrição na sua forma inativa compõe um complexo citosólico formado por uma região ligante de AhR, um dímero da proteína de choque térmico Hsp 90, uma proteína semelhante à imunofilina XAP 2 e a fosfoproteína p23. Entre os compostos xenobióticos que se ligam ao AhR estão os hidrocarbonetos poliaromáticos, hidrocarbonetos aromáticos halogenados planares, incluindo dioxinas policloradas (PCDDs) e furanos (PCDFs), bem como bifenilas policloradas (PCBs). A ligação do xenobiótico no receptor induz uma mudança conformacional que resulta na dissociação do dímero de Hsp 90 e a translocação do complexo AhR-substrato para o núcleo, a partir da interação com o translocador nuclear de aril hidrocarboneto (ARNT). Uma vez no núcleo, o complexo AhR-substrato reconhece sequências específicas de DNA, conhecidas como elementos de resposta a xenobióticos (XREs), modulando a expressão de genes relacionados com o metabolismo de xenobióticos, como genes de CYPs e genes que codificam enzimas da fase II de biotransformação (BUDINSKY *et al.*, 2014; CHIARO *et al.*, 2007; JURICEK; COUMOUL, 2018; LARIGOT *et al.*, 2018; SCHLENK *et al.*, 2008). A indução da expressão gênica por AhR, está esquematizada na Figura 1.4.

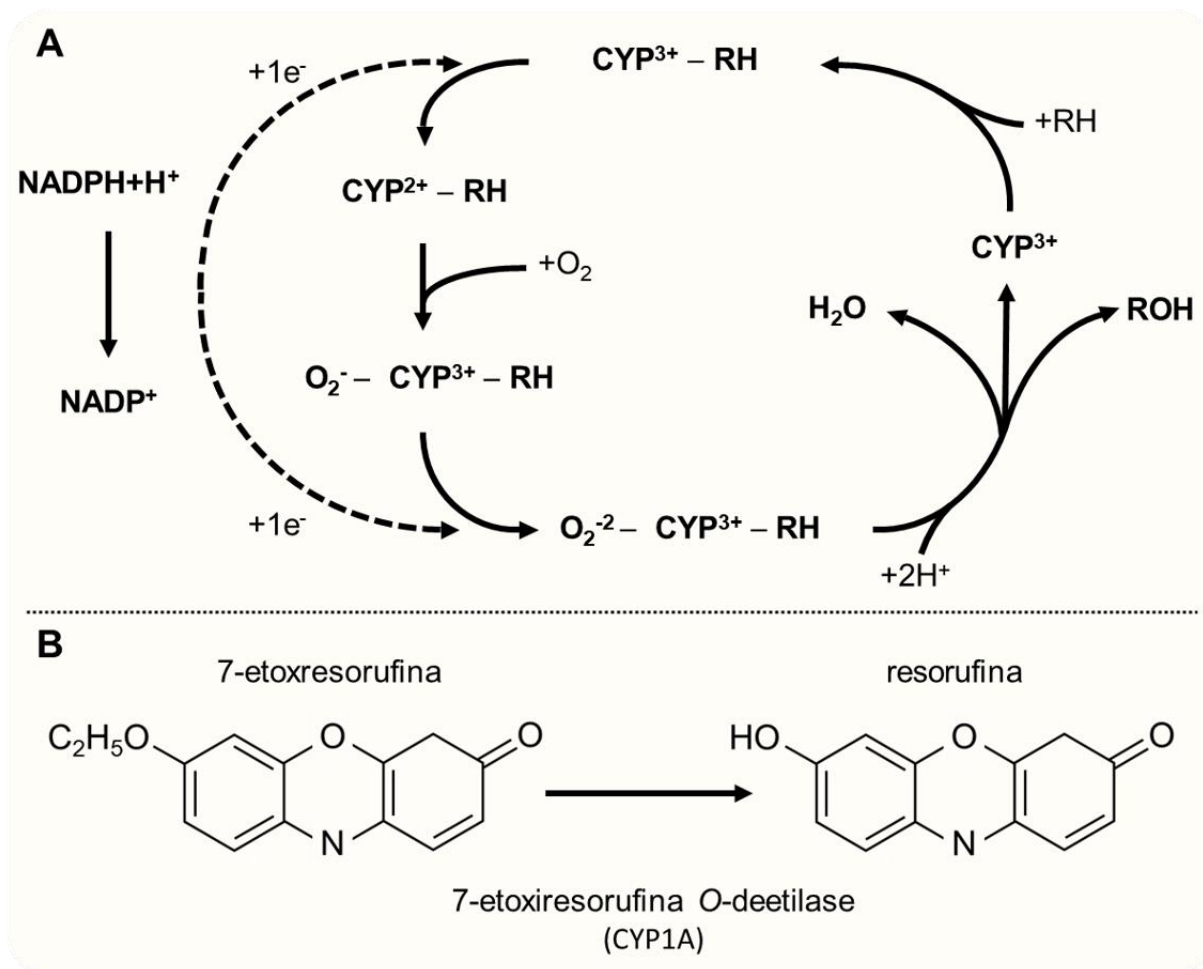


Figura 1.3 – A: Reação de oxidação das enzimas CYPs. RH representa o substrato das enzimas CYP, onde liga-se o oxigênio ao longo da reação. B: Reação da EROD (7-etoxiresorufina O-deetilase) catalisada pela CYP1A e frequentemente utilizada como biomarcador. Adaptado de Schlenk *et al.*, (2008).

Nas reações de fase II ocorre a conjugação enzimática de grupamentos polares endógenos ao xenobiótico ou aos metabólitos resultantes da fase I, tornando-os mais fáceis de serem excretados e impedindo que esses produtos se liguem a outros componentes celulares (TIERNEY *et al.*, 2013). As principais famílias de enzimas envolvidas nesta fase são as glutaciona S-transferases (GSTs), UDP-glicoronosiltransferase (UGTs) e PAPS-sulfotransferase (SULTs). Entre elas, as GSTs são responsáveis pela metabolização de uma grande variedade de compostos tóxicos em peixes através da conjugação com a glutaciona, cuja atividade é frequentemente utilizada em testes ecotoxicológicos (KARAMI *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2014; SADAUSKAS-HENRIQUE *et al.*, 2017). As isoformas citoplasmáticas das enzimas GSTs catalisam a conjugação de grupamentos polares endógenos, principalmente o tripeptídeo glutaciona (GSH), com o xenobiótico ou seus metabólitos intermediários resultantes da fase I, pela reação da GSH com um centro

eletrofílico do substrato (SCHLENK *et al.*, 2008). Outras isoformas integrais de membrana de GSTs apresentam funções importantes na defesa antioxidante (GLISIC *et al.*, 2015).

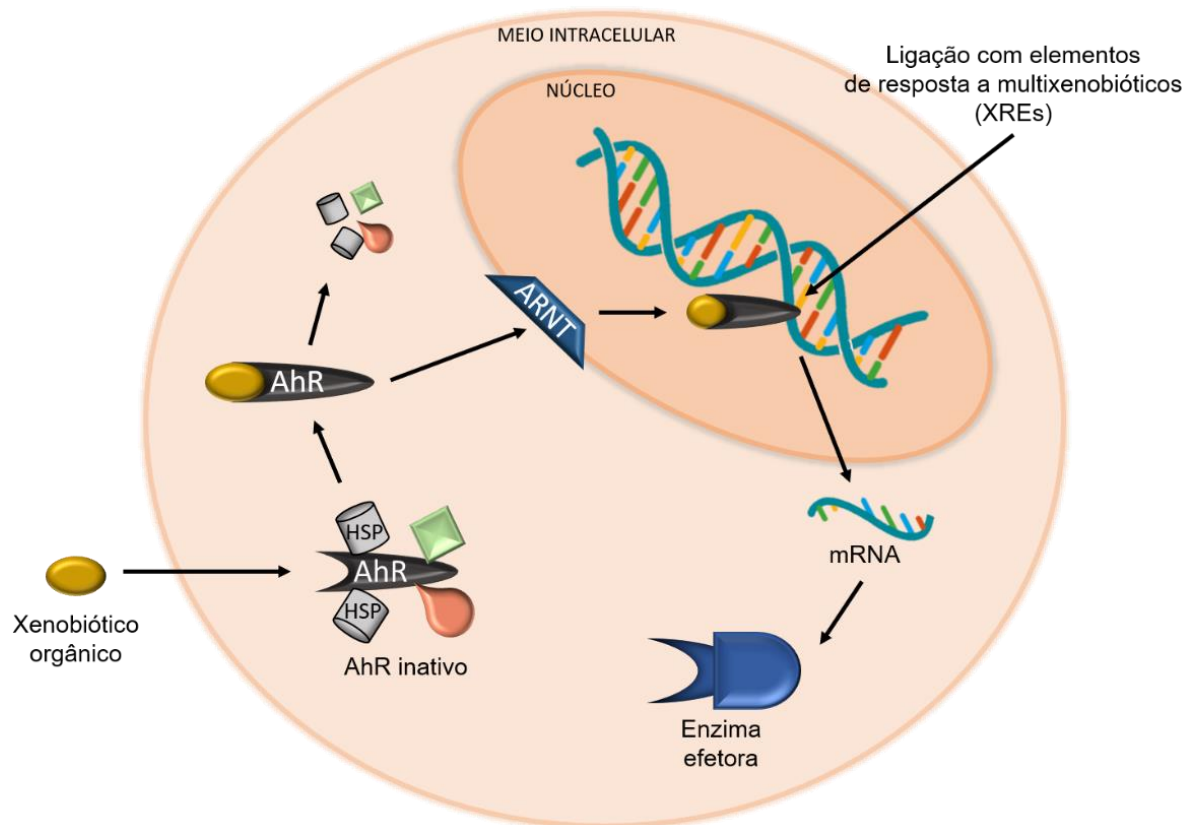


Figura 1.4 - Indução da expressão gênica pelo receptor aril-hidrocarbonetos (AhR). Modificado de Nikinmaa, (2014).

Como as fases I e II transformam compostos lipofílicos em compostos mais hidrofílicos, a difusão destes metabólitos através da bicamada lipídica se reduz. Desta forma, o efluxo e conseqüente diminuição intracelular de compostos potencialmente tóxicos ocorre através de proteínas transmembrana pertencentes à superfamília de proteínas do tipo ABC (*ATP-binding cassette*), que através da ligação e hidrólise do ATP obtêm energia para o transporte de substratos através das membranas celulares (BARD, 2000; EPEL *et al.*, 2008; FERREIRA; COSTA; REIS-HENRIQUES, 2014). Esse fenótipo é chamado de mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR – *Multixenobiotic Resistance*) e pode ser determinante na tolerância dos organismos aquáticos a ambientes contaminados (BARD, 2000).

Os transportadores ABC apresentam uma ampla distribuição filogenética e, em conjunto com as fases I e II de biotransformação, favorecem a detoxificação do organismo e a manutenção da integridade das estruturas celulares através da

excreção de xenobióticos não modificados e também de metabólitos (EPEL *et al.*, 2008), o que caracteriza a fase III de biotransformação (BARD, 2000; EPEL *et al.*, 2008; FERREIRA; COSTA; REIS-HENRIQUES, 2014). A MXR foi primeiramente descrita como fatores bioquímicos que conferem resistência multidroga (MDR) no câncer, ou seja, a resistência das células tumorais contra drogas não relacionadas estrutural e funcionalmente (FERREIRA; COSTA; REIS-HENRIQUES, 2014; LUCKENBACH; FISCHER; STURM, 2014). Atualmente as subfamílias de transportadores ABC que atuam na MXR foram identificadas em diversas espécies de peixes, com distribuição órgão-específica (COSTA *et al.*, 2012; FERREIRA; COSTA; REIS-HENRIQUES, 2014; LIU *et al.*, 2016; LONČAR *et al.*, 2010; LUCKENBACH; FISCHER; STURM, 2014). A integração das fases I, II e III de biotransformação estão ilustradas na Figura 1.5.

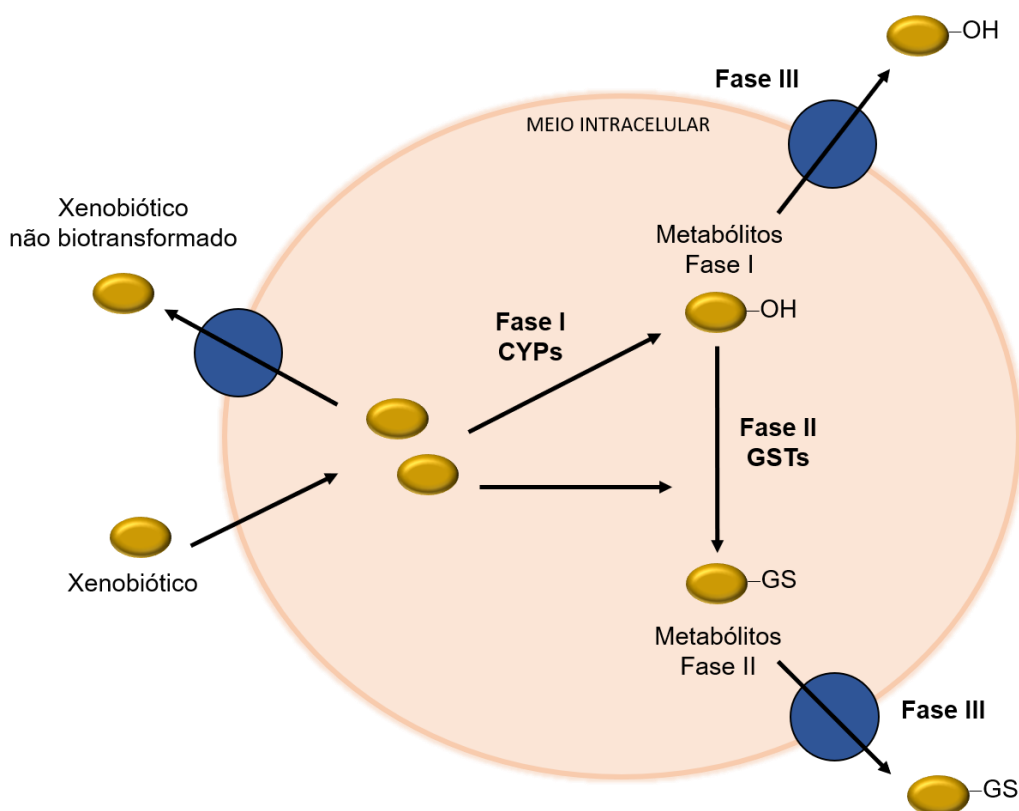


Figura 1.5 - Biotransformação de xenobióticos dividida em três fases (I, II, III). Modificado de Ferreira *et al.* (2014).

Após a atuação do mecanismo de biotransformação, o xenobiótico e seus metabólitos podem ser excretados por diversas vias, como o trato gastrointestinal, urina e brânquias. Os transportadores ABC, os mecanismos de filtração e secreção de compostos solúveis em água juntamente com as reações de biotransformação são determinantes na eliminação de xenobióticos e no estabelecimento da

homeostase corporal (TIERNEY *et al.*, 2013). Entre as rotas de excreção citadas, a presença de xenobióticos e seus metabólitos na bile é uma técnica amplamente utilizada para caracterizar a exposição dos organismos a contaminantes orgânicos, principalmente hidrocarbonetos (KOGLIN *et al.*, 2016; PAMPANIN *et al.*, 2016; REY-SALGUEIRO *et al.*, 2011).

2.4 Efeitos Tóxicos do Metabolismo de Xenobióticos

O metabolismo de xenobióticos deve ser destacado na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$), entre outros. Existem diversos mecanismos intracelulares, como metabolismo do oxigênio para a produção de energia que produzem ERO. Neste contexto, os organismos possuem um sistema altamente regulado de defesa antioxidante, formado por enzimas, proteínas e antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular (LUSHCHAK, 2016). Os antioxidantes não enzimáticos funcionam geralmente como sequestradores de radicais livres e incluem compostos solúveis em água, como a GSH e o ácido ascórbico (vitamina C), e compostos lipossolúveis, como os carotenoides, o retinol (vitamina A) e α -tocoferol (vitamina E). O antioxidante não-enzimático mais importante é a GSH, que atua na regulação redox celular pela neutralização direta de compostos pró-oxidantes e atua como cofator para enzimas antioxidantes (LUSHCHAK, 2016).

Uma vez que o equilíbrio entre produção de ERO e as defesas antioxidantes é rompido, o acúmulo de ERO gera um estado pró-oxidante no meio intracelular, causando a oxidação de componentes celulares como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (OTITOLOJU; OLAGOKE, 2011; SADAUSKAS-HENRIQUE *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). A lipoperoxidação resulta na degradação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, resultando na formação de aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinoneal (4-HNE). O MDA em concentrações elevadas pode provocar modificações em resíduos de aminoácidos (principalmente lisina) e reagir com bases de DNA gerando lesões mutagênicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A reação de lipoperoxidação inicia-se quando um hidrogênio é retirado do grupo metileno de lipídeos poli-insaturados pelas ERO, desencadeando uma cascata de reações que gera peróxidos. Assim, os danos causados pelas ERO podem ser considerados proporcionais aos níveis de

lipoperoxidação tecidual. A quantificação do MDA como indicador indireto de lipoperoxidação é considerado um biomarcador sensível de estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2016), muito utilizado em testes de toxicidade com peixes (ALVIM; MARTINEZ, 2019).

Outro efeito observado em organismos aquáticos expostos a contaminação é o dano genético. Danos no DNA são resultantes da exposição a compostos eletrofílicos, seja pela ação direta do xenobiótico, por seu produto ativado na biotransformação ou ainda pela produção de ERO resultantes deste processo (CHATTERJEE; WALKER, 2017). Adutos de DNA, quebras de cadeia simples e quebras de cadeia dupla e ocorrência de micronúcleos são os biomarcadores mais estudados capazes de revelar efeitos genotóxicos e mutagênicos dos xenobióticos. Como a integridade do DNA é essencial para a conservação da biodiversidade, os biomarcadores genotóxicos são muito importantes do ponto de vista ecológico, apresentando-se como ferramentas sensíveis no monitoramento dos efeitos subletais de contaminantes (COSSU-LEGUILLE; VASSEUR, 2013). Na detecção de danos no DNA o ensaio do cometa tem sido amplamente utilizado em diversos grupos, incluindo os peixes, devido à sua alta sensibilidade (GAJSKI *et al.*, 2019). É importante considerar que o ensaio do cometa detecta danos passíveis de reparo promovido pelo sofisticado sistema de reparo de danos no DNA, cuja expressão apresenta variação tecido-específica de acordo com o tipo celular e o metabolismo de cada órgão (ALI *et al.*, 2009; KIENZLER; BONY; DEVAUX, 2013; MOHANTY *et al.*, 2011). Dependendo do tipo celular, após a ação de um agente genotóxico, pode ser observada a diminuição dos danos ao longo do tempo devido à atuação no mecanismo de reparo (RAPHAEL *et al.*, 2014).

2.5 Benzo[a]pireno

Os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) são compostos orgânicos formados por carbono e hidrogênio, que contêm dois ou mais anéis carbônicos fundidos. Estes compostos provêm tanto de fontes naturais como de atividades humanas, sendo que as principais fontes de HPAs no ambiente são de origem antropogênica, principalmente pela queima de combustíveis fósseis, tabaco, incenso e incineração de lixo, ou pela produção e refinamento de óleos (EWA; DANUTA, 2017). Atualmente, os HPAs e seus derivados são largamente encontrados em ambientes marinhos e de água doce (SANTANA *et al.*, 2018).

Dentre os HPAs, o benzo[a]pireno (B[a]P) é um dos mais conhecidos e estudados (Figura 1.6). O B[a]P apresenta fórmula molecular $C_{20}H_{12}$, possui cinco anéis aromáticos, alto peso molecular (PM = 252,31) e origina-se principalmente da combustão incompleta de combustíveis fósseis, resíduos industriais e domésticos (LAWAL, 2017), atingindo os ambientes aquáticos principalmente por deposição atmosférica. O B[a]P é pouco solúvel em água e, por isso, em sistemas aquosos, tende a associar-se ao sedimento ou a matéria orgânica em suspensão (GREENFIELD; DAVIS, 2005; VANE; HARRISON; KIM, 2007).

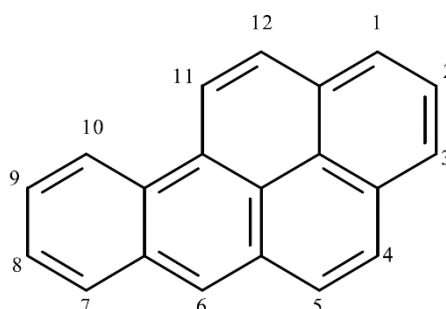


Figura 1.6 - Estrutura química da molécula de benzo[a]pireno.

O B[a]P apresenta uma alta afinidade pelo receptor AhR, sendo considerado um importante indutor das enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos, além de induzir o sistema de defesa antioxidante e causar danos em organismos aquáticos em decorrência da produção de ERO (BUDINSKY *et al.*, 2014; CHIARO *et al.*, 2007; JURICEK; COUMOUL, 2018; LARIGOT *et al.*, 2018). Durante a biotransformação, o B[a]P pode ser metabolizado em dióis epóxidos eletrofílicos (BPDEs), uma provável via que leva à formação de adutos de DNA (EWA; DANUTA, 2017). Além de ligar-se ao DNA, os BPDEs podem também reagir com proteínas e lipídios, sendo considerado o carcinógeno final do B[a]P (LAWAL, 2017). Os dióis epóxidos podem ser conjugados à GSH pela ação da GST, o que é considerado uma reação de detoxificação. Os epóxidos não conjugados à GSH são convertidos em fenóis ou dióis, os quais não sendo suficientemente polares podem então ser conjugados com ácido glucurônico ou sulfúrico para serem excretados (CROWELL *et al.*, 2011). Os metabólitos do B[a]P também podem ser formados em tecidos extra-hepáticos nos peixes, como brânquias e intestino, sendo reabsorvidos na corrente sanguínea e então liberados na vesícula biliar (COSTA *et al.*, 2011). Após a biotransformação, o B[a]P pode ser eliminado através da urina e bile (LUCKENBACH; FISCHER; STURM, 2014). As principais etapas da biotransformação do B[a]P estão descritas na Figura 1.7.

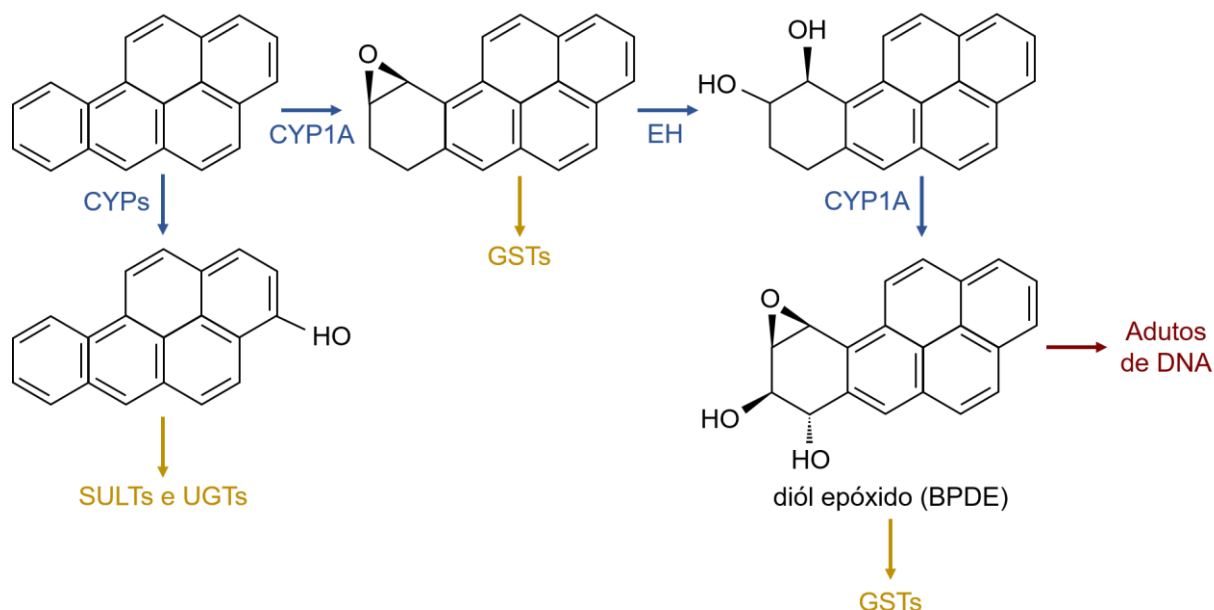


Figura 1.7 – Biotransformação de benzo[a]pireno. Como os compostos químicos podem ser modificados em diferentes posições moleculares, o esquema demonstra apenas algumas possibilidades de metabolização. Setas azuis indicam biotransformação de fase I; setas, amarelas indicam biotransformação de fase II; seta vermelha indica danos genotóxicos no DNA; EH indica atuação da enzima epóxido hidrolase. Adaptado de Schlenk *et al.*, (2008).

2.6 Modelo Experimental

A contaminação ambiental representa um sério risco para a ictiofauna, uma vez que os peixes ocupam a maioria dos ambientes aquáticos (FILHO *et al.*, 2018). Porém, muitos testes de toxicidade que seguem padrões internacionais e utilizam espécies modelo não são representativas da biodiversidade brasileira (MARTINS; BIANCHINI, 2011), pois não refletem os mecanismos de adaptação da biota local (BIELEN *et al.*, 2016; FREITAS; ROCHA, 2011; ZHANG *et al.*, 2019). Além disso, as diferentes espécies podem responder de maneira distinta à presença de um contaminante (LOGAN, 2007), e a capacidade de resposta dos biomarcadores exige uma compreensão dos mecanismos espécie-específicos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Já foi demonstrado na literatura que após a exposição à um xenobiótico, as diferentes espécies de um mesmo gênero podem apresentar alterações distintas nos sistemas enzimáticos. Por outro lado, a ocorrência de danos em macromoléculas pode ser semelhante nas diferentes espécies, demonstrando uma relação ecotoxicológica consistente e mais representativa. Assim, torna-se importante a avaliação de uma ampla gama de biomarcadores para a compreensão das alterações provocadas por um xenobiótico,

a fim de fornecer dados precisos aos processos de monitoramento e conservação (TINCANI *et al.*, 2019).

Dentre os peixes da região Neotropical, os teleósteos dulcícolas pertencentes à família Prochilodontidae ocorrem na América do Sul, desde as bacias hidrográficas à oeste dos Andes (Bacia do lago Maracaibo, rios versantes do Caribe e rios de declive do Pacífico no noroeste e sudoeste do Equador entre outros), até as bacias à leste dos Andes (Orinoco, Amazonas, Tocantins, São Francisco, Rio de La Plata, Lagoa dos Patos entre outros) (CASTRO; VARI, 2003) e pode representar de 50 a 80% da ictiomassa na bacia do Rio Orinoco e Amazonas (TAYLOR; FLECKER; HALL JR., 2006). Entre as espécies dessa família, o peixe *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), conhecido popularmente como curimba ou curimbatá (Figura 1.8) pode ser encontrado nas bacias do rio Paraná, do rio Paraguai e do rio Parnaíba do Sul (CASTRO; VARI, 2003). *P. lineatus* é uma espécie bentônica,

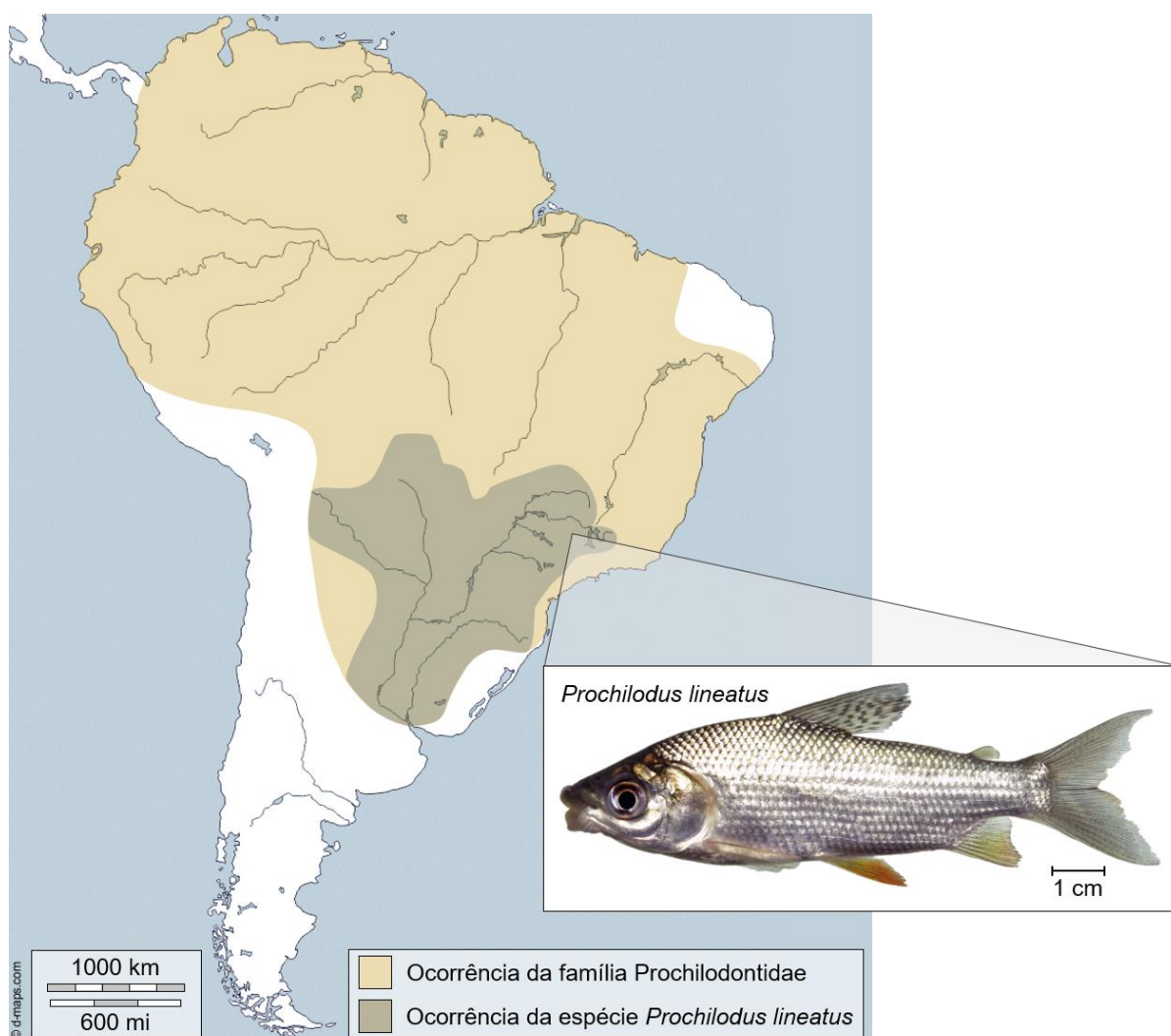


Figura 1.8 – Distribuição da família Prochilodontidae e da espécie Curimba, *Prochilodus lineatus* na América do Sul. Foto de *P. lineatus* por José Luís Olivan Birindelli (MZ/UEL). Mapa da América do Sul modificado de www.d-maps.com/carte.php?num_car=1414&lang=pt.

ecológica e economicamente importante e devido à sua abundância e distribuição vem sendo utilizada em estudos ecotoxicológicos na América do Sul, principalmente no Brasil e Argentina, tanto para testes em laboratório (ALVIM; MARTINEZ, 2019; POLLETA *et al.*, 2013) quanto no campo (VIEIRA *et al.*, 2016; PÉREZ *et al.*, 2018). *P. lineatus* já se mostrou sensível a diversas classes de contaminantes orgânicos, como benzo[a]pireno (Santos *et al.*, 2018), derivados de petróleo (SIMONATO *et al.*, 2011), detergentes (FIORELINI PEREIRA *et al.*, 2017), cafeína (SANTOS-SILVA; MONTAGNER; MARTINEZ, 2018) e agrotóxicos (VIEIRA; MARTINEZ, 2018).

OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar as características órgão-específicas dos mecanismos envolvidos na biotransformação de xenobióticos em *P. lineatus*, bem como os possíveis danos gerados nesse processo, considerando a variação temporal destes parâmetros após a indução por benzo[a]pireno.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a variação dos mecanismos de biotransformação de *P. lineatus* após 6, 24 e 96 h da indução por B[a]P através da atividade enzimática da CYP1A e GST e do mecanismo MXR em brânquias, fígado, cérebro e rim;
- Relacionar a transcrição do gene *cyp1a* com a atividade da enzima CYP1A nos diferentes órgãos ao longo do tempo;
- Relacionar as alterações no antioxidante não-enzimático GSH e a ocorrência de danos oxidativos em brânquias, fígado, cérebro e rim ao longo do tempo;
- Compreender o mecanismo de excreção do B[a]P em *P. lineatus* através das alterações nas concentrações do hidrocarboneto na bile ao longo do tempo;
- Caracterizar a influência do tempo na ocorrência de danos genotóxicos em brânquias; fígado, cérebro, rim e sangue de *P. lineatus*;
- Relacionar a ocorrência de danos ao longo do tempo com os mecanismos órgão-específicos de biotransformação em *P. lineatus*.

REFERÊNCIAS

- ALI, D. *et al.* Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 3, p. 650–656, 2009.
- ALVIM, T. T.; MARTINEZ, C. B. DOS R. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, 2018, p. 85–93, 2019.
- AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J. C.; MOUNEYRAC, C. **Aquatic Ecotoxicology: Advancing tools for dealing with emerging risks**, Academic Press, 2015. p. 518.
- ASHAUER, R.; JAGER, T. Physiological modes of action across species and toxicants: The key to predictive ecotoxicology. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 20, n. 1, p. 48–57, 1 jan. 2018.
- ASSEF, Y. A.; DI PRINZIO, C. Y.; HORAK, C. N. Differential activities of the multixenobiotic resistance mechanism in freshwater fishes inhabiting environments of Patagonia Argentina. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 19, 2018, p. 1–9, 2019.
- BARD, S. M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 357–389, 2000.
- BIELEN, A. *et al.* Differences in tolerance to anthropogenic stress between invasive and native bivalves. **Science of the Total Environment**, v. 543, p. 449–459, 2016.
- BUDINSKY, R. A. *et al.* Mode of action and dose-response framework analysis for receptor-mediated toxicity: The aryl hydrocarbon receptor as a case study. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 83–119, 2014.
- BURGOS-ACEVES, M. A. *et al.* MicroRNAs and their role on fish oxidative stress during xenobiotic environmental exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, 2017, p. 995–1000, 2018.
- CAJARAVILLE, M. P. *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2–3, p. 295–311, 2000.
- CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Family Prochilodontidae (Flannel mouth

- characiformes) In: Reis, E. R.; Kullander, S. O.; Ferraris, C. J. (Eds). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. EDIPUCRS, 2003. p. 729.
- CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, p. 235–263, 2017.
- CHIARO, C. R. *et al.* Evidence for an aryl hydrocarbon receptor-mediated cytochrome P450 autoregulatory pathway. **Molecular Pharmacology**, v. 72, n. 5, p. 1369–1379, 25 ago. 2007.
- CLEMENTS, W. H.; HICKEY, C. W.; KIDD, K. A. How do aquatic communities respond to contaminants? It depends on the ecological context. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 9, p. 1932–1940, 2012.
- COSSU-LEGUILLE, C.; VASSEUR, P. Aquatic Biomarkers. In: FÉRARD, J.-F.; BLAISE, C. (Eds.). **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 49–66.
- COSTA, J. *et al.* Comparison of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of benzo(a)pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**, v. 84, n. 10, p. 1452–1460, 2011.
- COSTA, J. *et al.* Gene expression analysis of ABC efflux transporters, CYP1A and GST α in Nile tilapia after exposure to benzo(a)pyrene. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 155, n. 3, p. 469–482, 2012.
- CROWELL, S. R. *et al.* Preliminary physiologically based pharmacokinetic models for benzo[a]pyrene and dibenzo[def,p]chrysene in rodents. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 257, n. 3, p. 365–376, 2011.
- DEPLEDGE, M. H.; AAGAARD, A.; GYORKOST, P. Assessment of Trace Metal Toxicity Using Molecular, Physiological and Behavioural Biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 1–3, p. 19–27, 1995.
- DOERING, J. A. *et al.* Tissue specificity of aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated responses and relative sensitivity of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to an AhR agonist. **Aquatic Toxicology**, v. 114–115, p. 125–133, 2012.
- EPEL, D. *et al.* Efflux Transporters: Newly Appreciated Roles in Protection Against Pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 11, p. 3914–3920, 2008.
- EWA, B.; DANUTA, M. Š. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA

- adducts. **Journal of Applied Genetics**, v. 58, n. 3, p. 321–330, 2017.
- FERREIRA, M.; COSTA, J.; REIS-HENRIQUES, M. A. ABC transporters in fish species: a review. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 1–12, 2014.
- FILHO, V. A. M. *et al.* Genetic applications in the conservation of Neotropical freshwater fish. In: RAY, S. (Ed.). **Biological Resources of Water**. IntechOpen, 2018. p. 249–284.
- FIORELINI PEREIRA, B. *et al.* Quantifying structural modifications of gills of two fish species *Astyanax altiparanae* (Lambari) and *Prochilodus lineatus* (Curimatá) after exposure to biodegradable detergents in urban lake water. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 80, n. 6, p. 338–348, 2017.
- FREITAS, E. C.; ROCHA, O. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: The importance of using native species as test organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 241–249, 2011.
- FURLEY, T. H. *et al.* Toward sustainable environmental quality: Identifying priority research questions for Latin America. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 14, n. 3, p. 344–357, 2018.
- GAJSKI, G. *et al.* The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 2 Vertebrates). **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 781, p. 130–164, 2019.
- GLISIC, B. *et al.* Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 50–62, 2015.
- GONZALEZ, P.; PIERRON, F. Omics in aquatic ecotoxicology: the ultimate response to biological questions? In: AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.-C.; MOUNEYRAC, C. (Eds.). **Aquatic Ecotoxicology**. Academic Press, 2015. p. 183–203.
- GREENFIELD, B. K.; DAVIS, J. A. A PAH fate model for San Francisco Bay. **Chemosphere**, v. 60, n. 4, p. 515–530, 2005.
- HÄDER, D. P. *et al.* Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. **Science of the Total Environment**, v. 713, p. 136586, 2020.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4^a ed. OUP Oxford, 2007.
- HODSON, P. V.; ADAMS, J.; BROWN, R. S. Oil toxicity test methods must be improved. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 302–311,

2019.

HOOKE, S. E.; GALLAGHER, E. P.; BATLEY, G. E. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 10, n. 3, p. 327–341, 2014.

JANZ, D. M. Biomarkers in fish ecotoxicology. In: FÉRARD, J.-F.; BLAISE, C. (Eds.). **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 211–220.

JURICEK, L.; COUMOUL, X. The aryl hydrocarbon receptor and the nervous system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, 2018.

KARAMI, A. *et al.* The effects of intramuscular and intraperitoneal injections of benzo[a]pyrene on selected biomarkers in *Clarias gariepinus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 6, p. 1558–1566, 2011.

KARR, J. R. Assessment of biotic integrity using fish communities. **Fisheries**, v. 6, n. 6, p. 21–27, 1981.

KASSAHN, K. S. *et al.* From transcriptome to biological function: Environmental stress in an ectothermic vertebrate, the coral reef fish *Pomacentrus moluccensis*. **BMC Genomics**, v. 8, p. 1–16, 2007.

KIENZLER, A.; BONY, S.; DEVAUX, A. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review. **Aquatic Toxicology**, v. 134–135, p. 47–56, 2013.

KIM, W. K. *et al.* Tissue-specific antioxidant responses in pale chub (*Zacco platypus*) exposed to copper and benzo[a]pyrene. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 92, n. 5, p. 540–545, 2014.

KOGLIN, S. *et al.* Toward understanding the impacts of sediment contamination on a native fish species: transcriptional effects, EROD activity, and biliary PAH metabolites. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 1–12, 2016.

KUMAR, G.; DENSLOW, N. D. Brief history of the development of the transfusion service. In: GUNTHER, F. A.; DE VOOGT, P. (Eds.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Springer, Cham, 2016. v. 241p. 1–38.

LARIGOT, L. *et al.* AhR signaling pathways and regulatory functions. **Biochimie**, v. 7, p. 1–9, 2018.

LAWAL, A. T. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. **Cogent Environmental Science**, v. 3, n. 1, p. 1–89, 2017.

LEE, J. W.; YOON, H. G.; LEE, S. K. Benzo(a)pyrene-induced cytochrome p4501A expression of four freshwater fishes (*Oryzias latipes*, *Danio rerio*, *Cyprinus carpio*,

- and *Zacco platypus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 3, p. 1041–1050, 2015.
- LEGGIERI, L. R. *et al.* Gills CYP1A of *Oncorhynchus mykiss* as a sensitive biomarker of crude oil pollution in freshwater environments. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 67, p. 61–65, 2019.
- LI, Z. H. *et al.* Alteration of cytochrome P450 1 regulation and HSP 70 level in brain of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) after chronic exposure to tributyltin. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 287–294, 2016.
- LIU, X. *et al.* Genome-wide identification, characterization and phylogenetic analysis of atp-binding cassette (abc) transporter genes in common carp (*Cyprinus carpio*). **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153246, 2016.
- LOGAN, D. T. Perspective on ecotoxicology of PAHs to fish. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 13, n. 2, p. 302–316, 2007.
- LONČAR, J. *et al.* Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, n. 2, p. 209–215, 2010.
- LUCKENBACH, T.; FISCHER, S.; STURM, A. Current advances on ABC drug transporters in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 165, p. 28–52, 2014.
- LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 711–747, 2016.
- MACÊDO, A. K. S. *et al.* Estuarine fish assemblages present a species-specific difference in the multixenobiotics resistance activity. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 331, n. 10, p. 530–539, 2019.
- MARTINS, S. E.; BIANCHINI, A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: Current status and implications for management. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 7, p. 1866–1875, 2011.
- MARTYNIUK, C. J.; SIMMONS, D. B. Spotlight on environmental omics and toxicology: a long way in a short time. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 19, p. 97–101, 2016.
- MOHANTY, G. *et al.* Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 1, p. 283–292, 2011.

- MORAES, J. S. *et al.* Zebrafish (*Danio rerio*) ability to activate ABC transporters after exposure to glyphosate and its formulation Roundup Transorb®. **Chemosphere**, p. 125959, 22 jan. 2020.
- MOUNEYRAC, C.; AMIARD-TRIQUET, C. Biomarkers of ecological relevance in ecotoxicology. In: FÉRARD, J.-F.; BLAISE, C. (Eds.). **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 221–236.
- MUSHTAQ, N. *et al.* Fresh water pollution dynamics and remediation. **Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation**, p. 27–50, 2020.
- NIKINMAA, M. Detoxification. In: NIKINMAA, M. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Elsevier Inc, p. 87–98.
- OSACHOFF, H.; AGGELEN, G. van. Ecotoxicogenomics. In: FÉRARD, J.-F.; BLAISE, C. (Eds.). **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 353–362.
- OTITOLOJU, A.; OLAGOKE, O. Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in *Clarias gariepinus* as useful biomarkers for monitoring exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 182, n. 1–4, p. 205–213, 2011.
- PAMPANIN, D. M. *et al.* Biological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their first metabolic products in in vivo exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 79, n. 13–15, p. 633–646, 2016.
- PÉREZ *et al.* *In situ* evaluation of the toxicological impact of a wastewater effluent on the fish *Prochilodus lineatus*: biochemical and histological assessment. **Ecological Indicators**, v. 84, p. 345–353, 2018.
- PETITJEAN, Q. *et al.* Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. **Science of the Total Environment**, v. 684, p. 371–380, 2019.
- PIÑA, B.; CASADO, M.; QUIRÓS, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1145–1154, 2007.
- POLLETA *et al.* Comet assay in gill cells of *Prochilodus lineatus* exposed *in vivo* to cypermethrin. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107. p. 385–390, 2013.
- PRITCHARD, J. B.; BEND, J. R.; AUGUSTINE, S. Mechanisms Controlling the Renal Excretion of Xenobiotics in Fish: Effects of Chemical Structure*. **Drug Metabolism Reviews**, v. 15, n. 4, p. 655–671, 1984.

- RAPHAEL, S. *et al.* Kinetic response of a genotoxicity biomarker in the three-spined stickleback and implication for environmental monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 102, n. 1, p. 6–11, 2014.
- REGOLI, F. *et al.* Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3- 4 SUPPL., p. 56–66, 2011.
- REY-SALGUEIRO, L. *et al.* Evaluation of 3-hydroxy-benzo[a]pyrene levels in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after waterborne exposure to Benzo[a]pyrene. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 93, n. 10, p. 2040–2054, 2011.
- RIMAYI, C.; CHIMUKA, L. Organ-specific bioaccumulation of PCBs and PAHs in African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) and common carp (*Cyprinus carpio*) from the Hartbeespoort Dam, South Africa. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, n. 11, 2019.
- SADAUSKAS-HENRIQUE, H. *et al.* Validation of a suite of biomarkers of fish health in the tropical bioindicator species, tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Ecological Indicators**, v. 73, p. 443–451, 2017.
- SANTANA, M. S. *et al.* Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 449–461, 2018.
- SANTOS-SILVA, T. G.; MONTAGNER, C. C.; MARTINEZ, C. B. R. Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 237–242, 2018.
- SANTOS, C. *et al.* Expression of cyp1a induced by benzo(a)pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 61, p. 30–37, 2018.
- SCHLENK, D. *et al.* Biotransformation in fishes. In: DI GIULIO, R.; HINTON, D. (Eds.). **The Toxicology of Fishes**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 1096.
- SIMONATO *et al.* Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 1400–1410, 2011.
- SNAPE, J. R. *et al.* Ecotoxicogenomics: The challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, v. 67, n. 2, p. 143–154, 2004.
- TAYLOR, B. W.; FLECKER, A. S.; HALL JR., R. O. Loss of a Harvested Fish

- Species. **Science**, v. 313, n. 5788, p. 833–836, 2006.
- TAYLOR, L. N.; SCROGGINS, R. P. Biological test methods in ecotoxicology. In: FÉRARD, J.-F.; BLAISE, C. (Eds.). **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 197–204.
- TIERNEY, K. B. *et al.* Organic contaminants and fish. In: TIERNEY, K. B.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.). **Organic Chemical Toxicology of Fishes**. Fish Physiology. Academic Press, 2013. v. 33, p. 1–52.
- TINCANI *et al.*, 2019. Climbing the taxonomic ladder: Could a genus be used as bioindicator? The ecotoxicological relationship between biomarkers of *Astyanax altiparanae*, *Astyanax bifasciatus* and *Astyanax ribeirae*. **Ecological Indicators**, v. 106, p. 105474, 2019.
- UNO, T.; ISHIZUKA, M.; ITAKURA, T. Cytochrome P450 (CYP) in fish. **Environmental Toxicology and P**, v. 34, p. 1–13, 2012.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.
- VANE, C. H.; HARRISON, I.; KIM, A. W. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments from the Mersey Estuary, U.K. **Science of the Total Environment**, v. 374, p. 112–126, 2007.
- VELDHOEN, N.; IKONOMOU, M. G.; HELBING, C. C. Molecular profiling of marine fauna: Integration of omics with environmental assessment of the world's oceans. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 1, p. 23–38, 2012.
- VIEIRA, C. E. D. *et al.* Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 44–56, 2016.
- VIEIRA, C. E. D.; MARTINEZ, C. B. DOS R. The pyrethroid Λ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 210, p. 958–967, 2018.
- WERNERSSON, A. S. *et al.* The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. **Environmental Sciences Europe**, v. 27, n. 1, p. 1–11, 2015.
- WRIGHT, S. H.; DANTZLER, W. H. Molecular and Cellular Physiology of Renal Organic Cation and Anion Transport. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 3, p. 987–1049, 2004.

YUAN, L. *et al.* New cytochrome P450 1B1, 1C1, 2Aa, 2Y3, and 2K genes from Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*): Molecular characterization, basal expression and response of rare minnow CYP1s and CYP2s mRNA exposed to the AHR agonist benzo[a]pyrene. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 209–216, 2013.

ZHANG, W. *et al.* The toxic effects of in situ exposure of a native fish species (*Anabas testudineus*) to electronic waste pollution. **Science of The Total Environment**, v. 690, p. 1170–1177, 2019 .

CAPÍTULO 2

Biotransformation mechanism in the fish *Prochilodus lineatus*: an organ-specific approach to *cyp1a* gene expression and biochemical activity

Caroline Santos; Claudia Bueno dos Reis Martinez

Manuscrito submetido à revista *Environmental Toxicology and Pharmacology*

Guide for Authors: www.elsevier.com/journals/environmental-toxicology-and-pharmacology/1382-6689/guide-for-authors

Biotransformation mechanism in the fish *Prochilodus lineatus*: an organ-specific approach to *cyp1a* gene expression and biochemical activity

Caroline Santos; Claudia Bueno dos Reis Martinez*

Laboratory of Animal Ecophysiology, Department of Physiological Sciences, Londrina State University, Londrina, PR, Brazil

*Corresponding author: Tel.: +55-43-33715146; E-mail: cbueno@uel.br

Highlights

- Biotransformation mechanisms was induced after B[a]P injection
- Induction in *cyp1a* transcription showed an organ-specific intensity over time
- EROD activity increased first in the liver and kidney and later in brain and gills
- The range of EROD activity in gills at 24 h was the most prominent
- The brain showed a slower response to the presence of the xenobiotic

Abstract

The biotransformation ability of the organism is the result of organ-specific responses. This paper presents a molecular and biochemical approach to elucidate the biotransformation mechanism in different organs of *Prochilodus lineatus* induced at 6, 24, and 96 h after a benzo[a]pyrene (B[a]P) injection. The induction in *cyp1a* transcription showed an organ-specific intensity at each time. The EROD (ethoxyresorufin-O-deethylase) activity increased rapidly (6 h) in the liver and the kidney; the gills and the brain showed an increase at 24 h; and the gills demonstrated the highest activity among all the organs tested. There was no increase in glutathione S-transferase (GST) activity or lipoperoxidation. The decreased hepatic glutathione content (GSH) may be due to its role as an antioxidant. B[a]P was detected in the bile, confirming the xenobiotic efflux from the metabolizing organs. The gills, liver, brain, and kidney of *P. lineatus* presented an integrated mechanism to deal with the xenobiotic biotransformation.

Keywords: temporal approach; benzo[a]pyrene; bile metabolites

1 Introduction

Aquatic organisms are sensitive to a wide range of environmental pollutants, which represent a severe risk to the ichthyofauna (Filho et al., 2018). Thus, fishes are considered excellent biological models for environmental monitoring and important in toxicity assessments (Karr, 1981). Knowledge of the absorption mechanism of contaminants, their behavior, and the metabolic responses in fishes has high ecological relevance, as fishes can be found throughout most aquatic environments, where they play an essential role in the food chain (Van der Oost et al., 2003). However, the biological impact of contamination is the result of a cascade of events, varying widely depending on the chemical and the species affected (Ashauer and Jager, 2018; Piña et al., 2007).

Historically, although many toxicity tests have been conducted following international standards and using exotic species, the data generated are not necessarily representative of the Brazilian biodiversity (Martins and Bianchini, 2011). The sensitivity of neotropical native species as well as the local conditions should be considered in ecotoxicological assessments, as they reflect specific impacts on local biota, as well as adaptation mechanisms of species (Bielen et al., 2016; Freitas and Rocha, 2011; Zhang et al., 2019). In most cases, these native species are more sensitive to environmental pollutants than exotic species belonging to the same group (Martins and Bianchini, 2011). Thus, evaluation of the sensitivity and mechanism of toxicity of different contaminants in native fish species should help to better predict impacts on local ecosystems and delineate meaningful environmental quality criteria (Furley et al., 2018). The neotropical freshwater teleost, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), has been widely used in ecotoxicological studies and has already been shown to be sensitive to several classes of contaminants, including benzo[a]pyrene (Santos et al., 2018), oil products (Simonato et al., 2011), pesticides (Vieira and Martinez, 2018), and other organic molecules, such as detergents (Fiorelini Pereira et al., 2017) and caffeine (Santos-Silva et al., 2018).

Among different fish species, considerable differences in metabolic responses to environmental pollution are apparent (Lee et al 2015). The severity and duration of a biological response are directly linked to the biotransformation ability of the whole organism, which determines the accumulation, excretion rates, biological half-life, and persistence of pollutants (Tierney et al., 2013). In addition, different

organs of the same species may present different responses to contaminants. The organ-specific responses demonstrate the physiological function, inducible biotransformation ability, and length of response of each organ after a toxicant uptake (Lee et al., 2015; Leggieri et al., 2019).

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are organic compounds containing two or more fused carbon rings in various structural configurations. The most widely studied PAH is benzo[a]pyrene (B[a]P), a product from the incomplete combustion of fossil fuels, and industrial/domestic waste (Ewa and Danuta, 2017). Exposure to B[a]P induces enzyme systems involved in xenobiotic metabolism due to its high affinity to the aryl hydrocarbon receptor (AhR), which is responsible for activating a series of genes encoding biotransformation enzymes (Budinsky et al., 2014; Chiaro et al., 2007; Juricek and Coumoul, 2018; Larigot et al., 2018).

The biotransformation of xenobiotics is a cellular enzymatic process characterized by a change in the original structure of a chemical compound to a hydrophilic metabolite, which is more readily removable by the excretion mechanisms (Tierney et al., 2013; Van der Oost et al., 2003). Phase I of biotransformation is considered the primary step in the metabolism of xenobiotics and involves oxidation, reduction, and hydrolysis reactions, catalyzed by enzymes belonging to the superfamily cytochrome P450 (CYP 450) (Tierney et al., 2013; Uno et al., 2012). The most studied phase I enzyme in fish is CYP1A, and the expression of the *cyp1a* gene as well as its catalytic activity, measured by EROD (ethoxyresorufin-*O*-deethylase) activity, are commonly used as biomarkers for exposure to organic compounds (Doering et al., 2012; Koglin et al., 2016). During phase II reactions, the enzymatic conjugation of endogenous polar groups to the xenobiotic or its metabolites from phase I occurs, making them easier to excrete and preventing these metabolites from binding to other cellular components (Tierney et al., 2013). The most studied phase II reactions in fish include glutathione (GSH) conjugation catalyzed by the glutathione S-transferases family (GSTs) (Banni et al., 2009; Lu et al., 2009; Sadauskas-Henrique et al., 2017). Commonly, the excretion of PAHs and their metabolites occurs via the gastrointestinal tract: the hepatocytes promote the compound efflux into the gallbladder for further excretion through bile release (Collier et al., 2014; Luckenbach et al., 2014). The metabolite content in bile is a widely used technique to characterize the exposure of organisms to HPAs (Koglin et al., 2016; Pampanin et al., 2016; Rey-Salgueiro et al., 2011).

The biotransformation mechanism produces reactive oxygen species (ROS), and part of the toxicity of PAHs is due to induction of oxidative stress, causing the oxidation of cellular components, resulting from imbalance between the production of ROS and the cellular antioxidant defense capacity (Lushchak, 2016), such as the oxidation of polyunsaturated fatty acids (lipid peroxidation), proteins, and DNA structure (Otitoloju and Olagoke, 2011; Sadauskas-Henrique et al., 2017; Zhang et al., 2019). In this context, organisms have a regulated system of antioxidant defense protective against ROS, formed by enzymes and proteins, as well as low molecular mass non-enzymatic antioxidants. The most important non-enzymatic antioxidant is GSH, acting in redox regulation both through direct neutralization of pro-oxidant compounds or by serving as a cofactor for ROS-detoxifying enzymes (Lushchak, 2016).

The liver, gastrointestinal tract, and gills are the organs with the highest content of biotransformation enzymes in fish (Tierney et al., 2013), although many other organs present biotransformation ability. In fact, the biotransformation enzyme isoforms are differentially expressed in different organs (Glisic et al., 2015; Yuan et al., 2013), and, consequently, characterize the response pattern of each organ after xenobiotic exposure. The sensitivity of the liver and gills to biotransformation induction of B[a]P was shown in the liver and gills of *P. lineatus*, however each organ demonstrated a specific response over a short-time period (24 h) (Santos et al., 2018), which demands further investigation, as well as the role of other organs in the integrated biotransformation response of the organism. Since the biotransformation ability of different organs represents the sensitivity of native species to xenobiotic exposure, this paper presents an organ-specific integrated biomarker approach to elucidate the processes involved in the cellular mechanism of biotransformation of the fish *P. lineatus* induced by B[a]P, considering the *cyp1a* transcription and biochemical biomarkers over time (96 h).

2 Material and Methods

2.1 Experimental procedures

Juveniles of *Prochilodus lineatus* (13.98 ± 0.19 cm; 56.02 ± 2.37 g; mean \pm SE; n = 180) were obtained from local fish farms. The animals were acclimated in the laboratory for seven days in 500 L tanks containing clean and dechlorinated

water with constant aeration (25.39 ± 0.33 °C; pH 7.7 ± 0.10 ; 6.90 ± 0.17 mg O₂ L⁻¹; conductivity: 2.83 ± 0.21 mS cm⁻¹), and a photoperiod set at 12: 12 h (light: dark). The animals were fed every 48 h with fish food containing 36% protein (Guabi, Brazil), until feeding was suspended 24 h before the experiment started.

After the acclimation period, the animals were anesthetized with benzocaine (0.1 g L⁻¹) and divided into two groups: the fish of the experimental group (B[a]P) received a single intraperitoneal injection of benzo(a)pyrene (C₂₀H₁₂ - Sigma Aldrich, Brazil) dissolved in canola oil at a dose of 20 mg kg⁻¹. The animals of the oil group (OIL) received only one dose of the vehicle in the same volume used for the experimental group (1 mL kg⁻¹). The dose of B[a]P and the use of canola oil as a vehicle were defined based on a previous work of our laboratory (Santos et al., 2018). This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the State University of Londrina (Process # 6625.2017.37).

After injection, each group of animals was transferred to a 50L aquarium containing clean and dechlorinated water, with five animals in each aquarium and two replicas per group (n = 5 per replicate; n = 10 per group), where they remained for different times (6, 24, or 96 h). Independent experiments were performed for each period. At all these periods, the fish were removed from the tank and anesthetized in benzocaine (0.1 g L⁻¹), killed by medullar section to remove the gills, liver, brain, kidney, and gallbladder. The gallbladder was pierced, and the bile drained into a microtube protected from the light. The other organs were divided into two parts; one was immersed in Trizol® (Invitrogen - Life Technologies, USA) in individual cryogenic tubes and immediately frozen in liquid nitrogen for molecular analysis, and the other part was transferred to individual microtubes for biochemical analysis. All samples were stored at -72 °C until the respective analyses were performed.

2.2 Isolation of total RNA and cDNA synthesis

The total RNA of each organ was extracted using the Trizol® protocol, according to the manufacturer's instructions, with modifications described in Santos et al. (2018). The total RNA was treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA) to eliminate contamination with genomic DNA, according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration was estimated in a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) at 260 nm. The values for 260/ 280 nm (Mean ± EP) were 1.98 ± 0.15 . To

ensure the integrity of the total RNA, the 28S and 18S ribosomal RNA bands were confirmed in 1% agarose gel, according to Aranda et al. (2012).

The cDNA synthesis of each sample was performed from the total RNA treated with DNase on a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) using the cDNA High Capacity Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), according to the manufacturer's instructions. The thermal cycler program was performed using the following conditions: step 1 at 25 °C for 10 minutes, step 2 at 37 °C for 120 minutes, step 3 at 85 °C for 5 minutes, and finished at 4 °C.

2.3 qPCR reactions

The qPCR was conducted using Platinum SYBR Green qPCR Supermix - UDG (Invitrogen - Life Technologies, USA) ($10 \mu\text{L}^{-1}$), 1 μL of each pair of primers ($10 \text{ pmol}\mu\text{L}^{-1}$), 2 μL of DEPC water, and 4 μL of cDNA from each sample, bringing the final reaction volume to 18 μL . The qPCR reactions were performed under the following conditions: 50 °C for 2 min, 95 °C for 5 min, and 35 cycles (95 °C/ 15 s, 60 °C/ 15 s, 72 °C/ 20 s) in a Techne Quantica Real Time PCR Thermal Cycler. The melting curve was analyzed at the end of each reaction with a temperature gradient of 60 to 95 °C, and a 5 second read every 0.5 degrees. Reactions were performed in triplicate. Quantsoft 1.1.35 software (Techne) was used to assess the data. The qPCR evaluated the *cyp1a* gene of phase I of biotransformation and the β -actine gene was used as reference. The primers used were previously established for the fish *P. lineatus* in Santos et al. (2018). The data were calculated using the method $\Delta\Delta\text{CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

2.4 Biochemical biomarkers

Samples of the gills, liver, brain, and kidney were homogenized in a sonicator (Q125 - QSonica) in potassium phosphate buffer (0.1 M; pH 7) and then centrifuged (13000 g, 20 min, 4 °C). The supernatant was stored in an ultrafreezer (-72 °C) until the time of analysis. The CYP1A catalytic activity was determined by EROD activity according to Eggens and Galgani (1992), through the conversion of 7-ethoxyresorufin into resorufin during 30 min (ex/ em: 530/ 590 nm). The activity of glutathione S-transferase (GST) was measured according to Keen et al. (1976), by the GST catalyzed conjugation of reduced glutathione (GSH) with 1-chloro- 2,4-

dinitrobenzene (CDNB) monitored for 1 min at 340 nm. Nonprotein thiol content was determined according to Beutler et al. (1963), by the reaction of glutathione with the substrate 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), forming thiolate (TNB), at 412 nm. Lipid peroxidation was estimated by the TBARS assay, according to Camejo et al. (1998), based on the production of malondialdehyde (MDA), one of the final products of lipid peroxidation, after incubating the supernatants for 1 h with thiobarbituric acid (ex/ em: 530/ 590 nm). The total protein content of the sample was used to normalize the EROD, GSH, GST, and TBARS data. The concentration of total proteins was determined by the Bradford method (1976), based on the reaction of proteins with Coomassie Brilliant Blue G-250 dye (Sigma Aldrich, Brazil) and determined at 595 nm.

2.5 B[a]P concentration in bile

The concentration of B[a]P in bile was determined fluorometrically at a fixed wavelength, according to the recommendations of Aas et al. (2000b). The bile samples were diluted 1: 1600 in ethanol (48 %) and the fluorescence of B[a]P was measured at 380/ 430 (ex/ em). The concentrations of B[a]P were determined from a standard curve of B[a]P and the data expressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$. The Spearman rank was applied to detect non-linear correlations between the concentration of B[a]P in bile and the time.

2.6 Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm standard error. The means obtained for all analyses were compared (Oil X B[a]P) at each experimental time by parametric analysis (Student's t test) or non-parametric analysis (Mann-Whitney), according to the distribution of data (normality and homoscedasticity). We considered significant values of $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Expression of *cyp1a*

All the organs of *P. lineatus* tested showed significantly higher relative expression of *cyp1a* during at least one time analyzed after the injection of B[a]P in comparison to the respective OIL groups ($p < 0.001$) (Fig. 2.1), although each organ

presented a distinct dynamic in the transcription of this gene. The relative expression of *cyp1a* in gills increased at 6 h and reached its maximum value at 24 h (~51-fold), while at 96 h the transcription of *cyp1a* returned to baseline values (Fig 2.1 A). In the liver, the dynamics of *cyp1a* transcription induction showed a similar pattern to the gills: a significant increase at 6 h and highest peak also at 24 h (~140-fold), whereas at 96 h the relative expression continued to be significantly increased (Fig. 2.1 B). The brain and kidney showed inverse patterns in the relative expression of *cyp1a* over time. For the brain, the values of relative expression were significantly higher in the B[a]P group at all experimental times, with a gradual increase until reaching maximum induction at 96 h (~167-fold) (Fig. 2.1 C). For the kidney, the transcription peak of B[a]P was at 6 h (~159-fold), and, despite the relative expression values remaining significantly higher at all experimental times, there was a gradual decrease

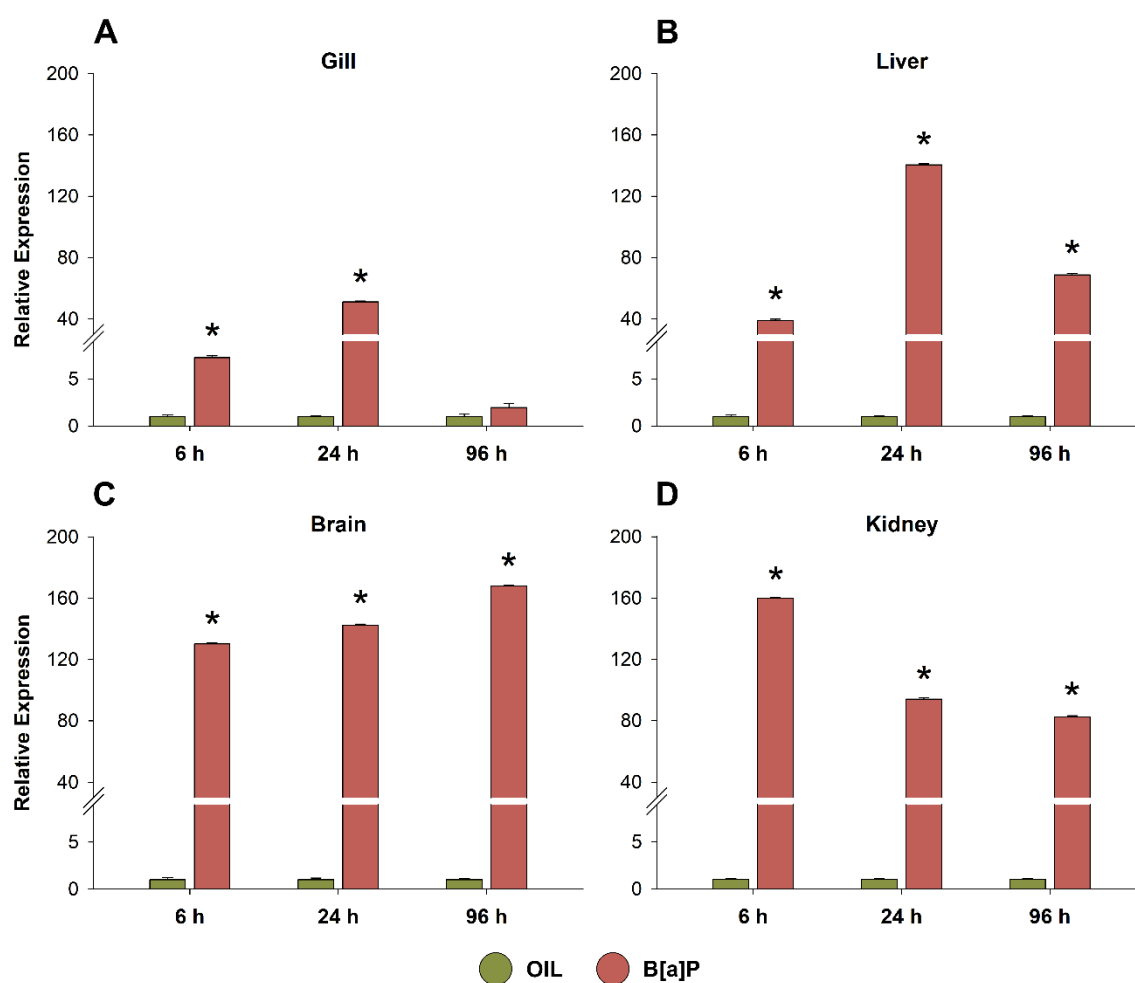


Fig 2.1. *cyp1a* relative gene expression (Mean \pm SE, n = 8-10) in the gills (A), liver (B), brain (C), and kidney (D) of *P. lineatus* at 6, 24, and 96 h after intraperitoneal injection of B[a]P (20 mg kg⁻¹) or only the vehicle (OIL). The values were normalized by the expression of the reference gene β -actine. *Indicates a significant difference between the B[a]P group and the respective OIL group at the same experimental time ($p < 0.05$).

in the relative expression over time (Fig 2.1 D). Brain tissue exhibited the highest level of fold-induction compared to gills, liver, and kidney.

3.2 EROD activity

EROD activity was significantly higher in the B[a]P groups during at least one experimental time for all organs tested (Fig. 2.2). Gill EROD activity showed a significant increase in the B[a]P group compared to the OIL group only at 24 h after injection ($U = 16.000$, $p = 0.037$) (Fig 2.2 A). The liver of fish injected with B[a]P demonstrated significantly higher EROD activity at 6 h ($t = -2.582$, $p = 0.022$) and returned to baseline values at longer experimental times (Fig 2.2 B). EROD brain activity significantly increased at 24 h ($t = -3.364$, $p = 0.004$) and 96 h ($t = -3.231$, $p = 0.007$) (Fig 2.2 C). The kidney was the only organ that showed a significant increase in EROD activity at all times: 6 h ($t = -3.181$, $p = 0.005$), 24 h ($t = -3.179$, $p = 0.010$),

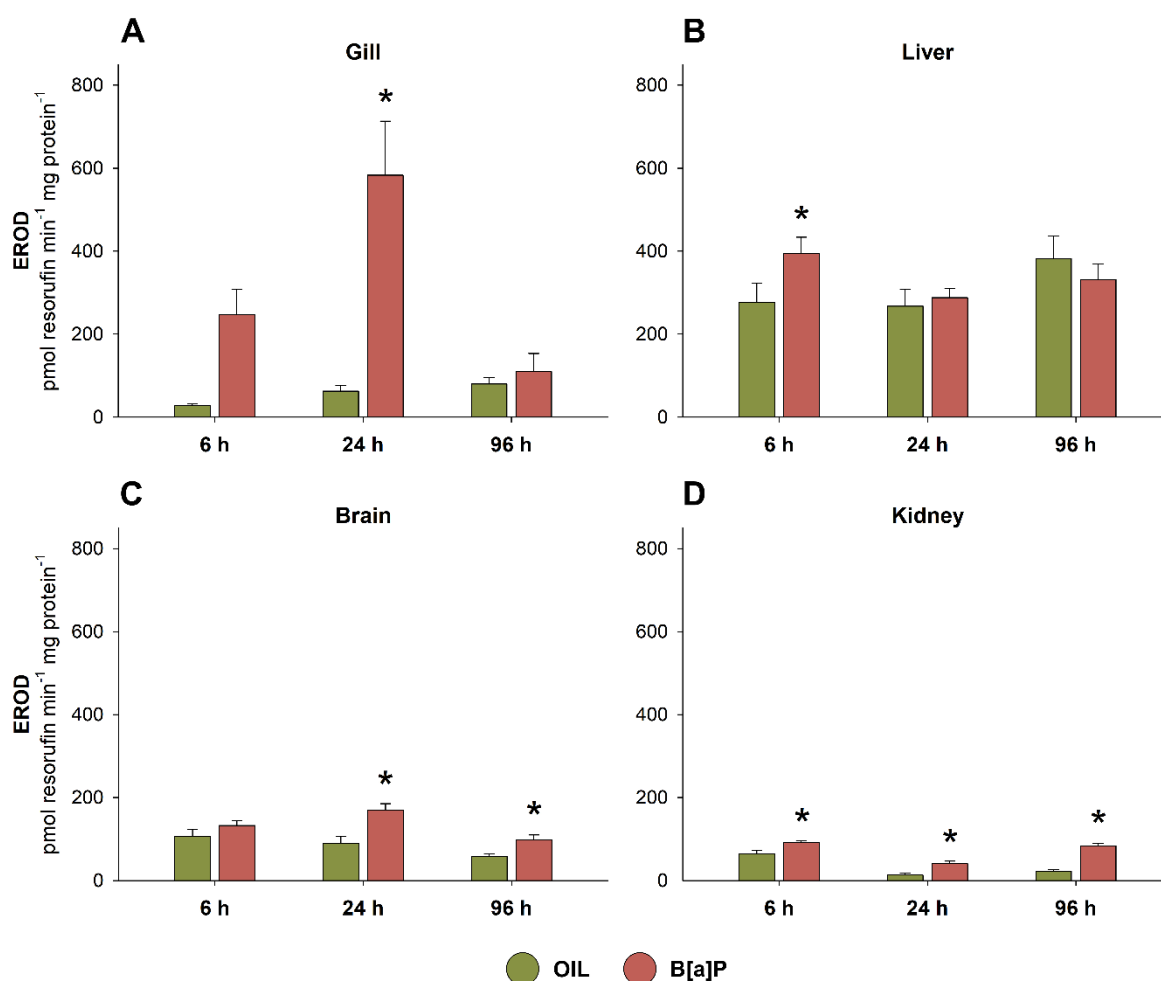


Fig 2.2. EROD activity (mean \pm SE, $n = 8-10$) in the gills (A), liver (B), brain (C), and kidney (D) of *P. lineatus* at 6, 24, and 96 h after intraperitoneal injection of B[a]P (20 mg kg⁻¹) or only the vehicle (OIL). * Indicates a significant difference between the B[a]P group and the respective OIL group at the same experimental time ($p < 0.05$)

and 96 h ($t = -8.576$, $p < 0.001$) (Fig 2.2 D).

3.3 GST activity

The activity of GST did not vary significantly in the different organs 6 and 24 h after the B[a]P injection (Fig 2.3). A significant variation in relation to the OIL was observed only in the liver after 96 h ($t = 2.838$, $p = 0.013$), which showed lower values of GST activity (Fig 2.3 B).

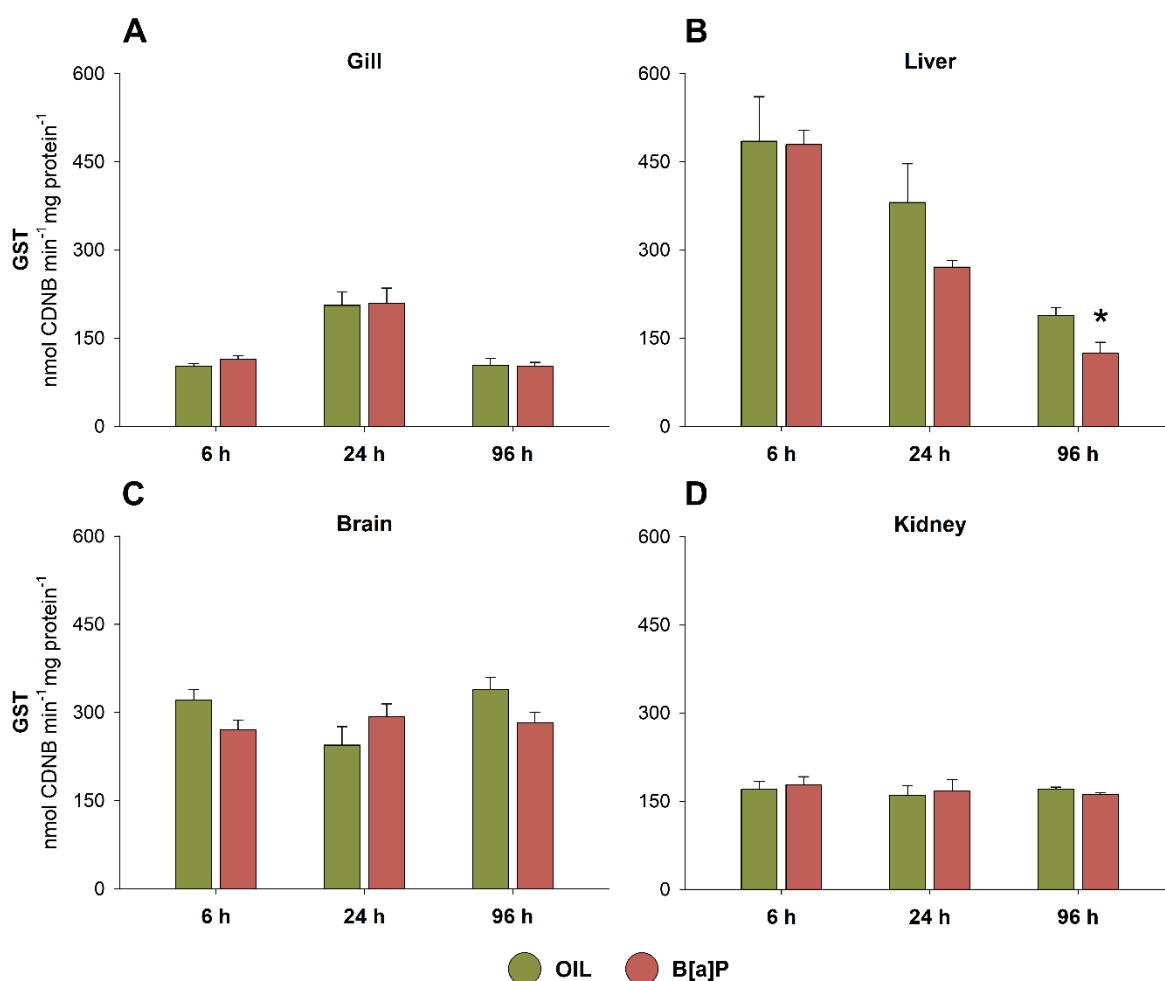


Fig 2.3. GST activity (mean \pm SE, $n = 8-10$) in the gills (A), liver (B), brain (C), and kidney (D) of *P. lineatus* at 6, 24, and 96 h after intraperitoneal injection of B[a]P (20 mg kg^{-1}) or only the vehicle (OIL). * Indicates a significant difference between the B[a]P group and the respective OIL group at the same experimental time ($p < 0.05$).

3.4 Nonprotein thiols

Although no difference was observed in nonprotein thiols from the gills, brain, and kidney (Fig. 2.4), the liver from the B[a]P group showed a lower content of nonprotein thiol than the OIL group at 6 h ($U = 4.000$, $p = 0.002$) and 96 h ($U = 7.000$, $p = 0.002$) (Fig. 2.4 B).

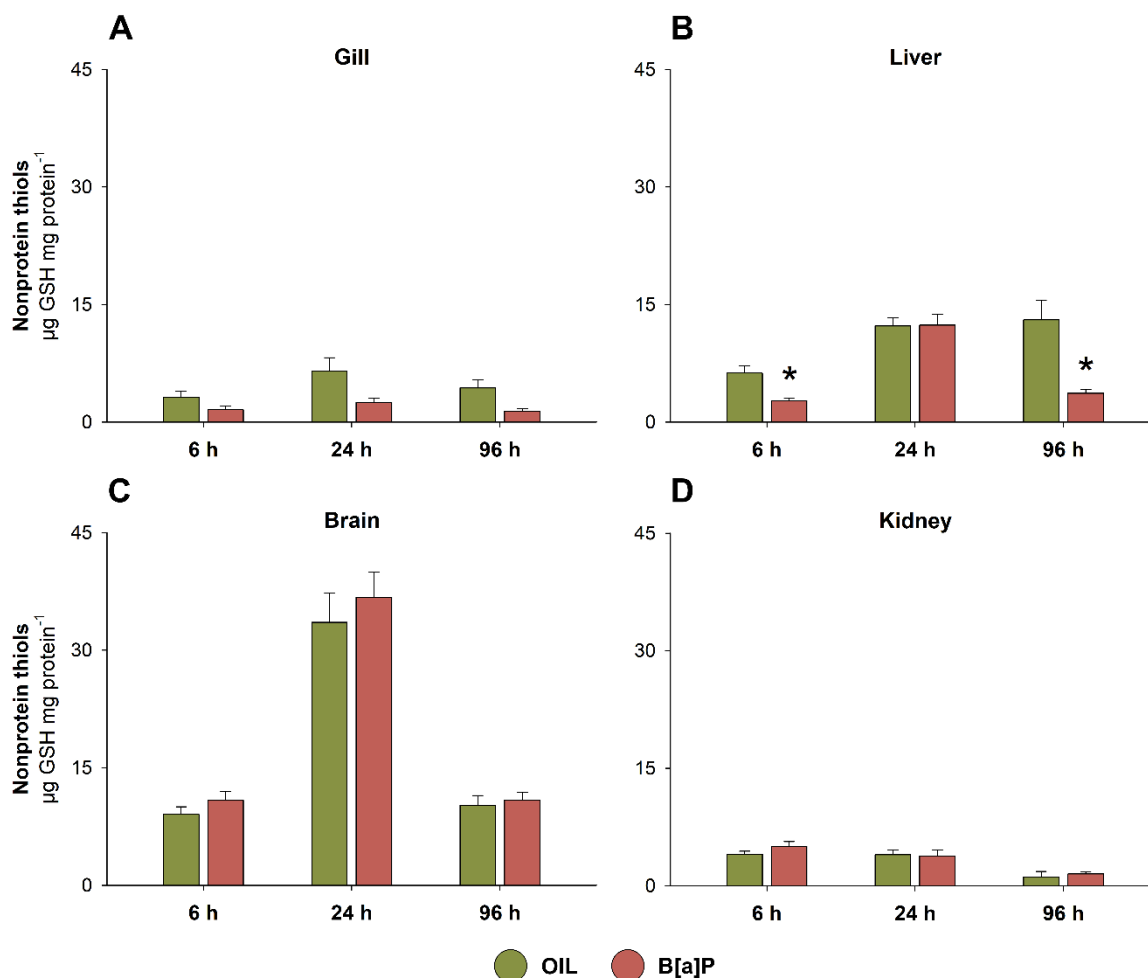


Fig 2.4. Content of nonprotein thiols (mean \pm SE, $n = 5-10$) in the gills (A), liver (B), brain (C), and kidney (D) of *P. lineatus* at 6, 24, and 96 h after intraperitoneal injection of B[a]P (20 mg kg⁻¹) or only the vehicle (OIL). * Indicates a significant difference between the B[a]P group and the respective OIL group at the same experimental time ($p < 0.05$).

3.5 Lipid peroxidation

Intraperitoneal injection of B[a]P did not lead to any significant changes in LPO in any of the organs evaluated at any experimental time (Fig. 2.5).

3.6 Concentration of B[a]P in bile

The B[a]P concentration in bile increased significantly at 6 h ($U = 0.000$; $p = 0.001$), 24 h ($t = -11.942$; $p = 0.001$), and 96 h ($t = -21.273$; $p = 0.001$) after B[a]P injection (Fig 2.6). The highest concentration of B[a]P found was at 6 h (17.739 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Furthermore, using the Spearman correlation coefficient, the B[a]P concentration in bile demonstrated a strong significant correlation between the experimental time and concentration values, where $\rho = -0.749$ ($p = 2e^{-10}$).

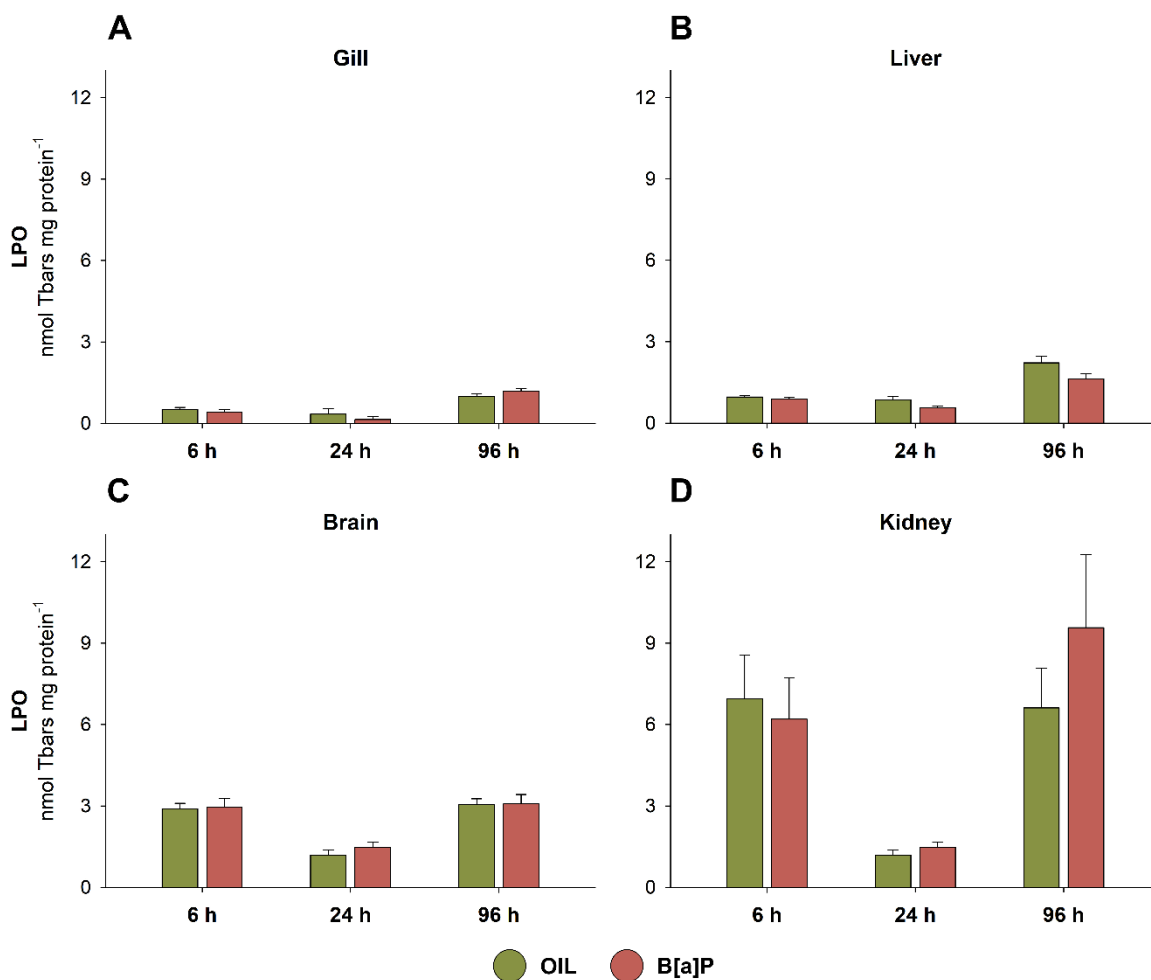


Fig 2.5 Lipid peroxidation (LPO) (mean \pm SE, n = 5-10) of in the gills (A), liver (B), brain (C), and kidney (D) of *P. lineatus* at 6, 24, and 96 h after intraperitoneal injection of B[a]P (20 mg kg⁻¹) or only the vehicle (OIL).

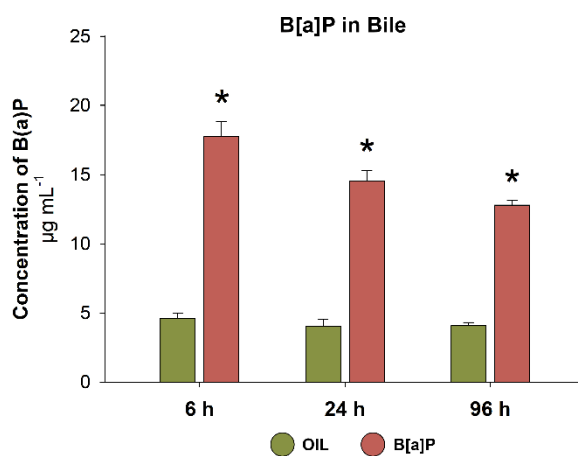


Fig 2.6. B[a]P concentration (mean \pm SE, n = 8) in the bile of *P. lineatus* at 6, 24, and 96 h after intraperitoneal injection of B[a]P (20 mg kg⁻¹) or only the vehicle (OIL) (p < 0.05). * Indicates a significant difference between the B[a]P group and its respective OIL group at the same experimental time (p < 0.05).

4 Discussion

The results from our experiments show that the gills, liver, brain, and kidney of the Neotropical fish *P. lineatus* presented a distinct dynamic in the response to B[a]P, with an organ-specific pattern and an integrated mechanism to deal with the xenobiotic biotransformation. The different responses among organs are related to the conserved physiological function and the constitutive and inducible biotransformation ability of each organ (Leggieri et al., 2019).

In general, molecular interactions and gene expression profiles represent the first level of integration between environmental factors and the corresponding cellular response mechanisms (Qian et al., 2014; Van der Oost et al., 2003), which enables characterization of cellular metabolism disorders before morphological changes or damage occur. The transcription of the target gene *cyp1a* is regulated by the cytosolic transcriptional factor aryl hydrocarbon receptor (AhR). The B[a]P binds to the receptor and the complex is translocated to the nucleus. The complex subsequently recognizes and binds to specific DNA sequences called xenobiotic response elements (XRE) and after interaction with cofactors, modulates the expression of genes related to xenobiotic metabolism (Budinsky et al., 2014; Chiaro et al., 2007; Juricek and Coumoul, 2018; Larigot et al., 2018). The *cyp1a* relative expression induction in all tested organs of *P. lineatus* indicates the decisive role of each organ in an integrated process of biotransformation after a chemical stimulus. At 96 h, the highest fold-induction of *cyp1a* relative expression was shown in the brain, and the capacity of transcription induction among organs was in the order brain > kidney > liver.

Although the induction of *cyp1a* in different organs of *P. lineatus* shows the biotransformation ability of each of the studied organs, the changes in transcription levels is not always consistent with enzyme activity. Herein, the response pattern of *cyp1a* expression and EROD activity was different in each organ. Whereas the intraperitoneal injection of B[a]P strongly induced *cyp1a* expression after 6 h, 24 h, and 96 h, the increase in EROD activity did not present the same pattern, given that at some experimental times the expression was induced but no changes were detected in enzyme activity. This is an important observation that demonstrates the constitutive function of each organ and how this function influences the response rate after the xenobiotic influx. Since the induction of EROD by B[a]P

requires transcription and protein synthesis, differences in mRNA levels relative to enzyme activity could reflect previous existing enzyme activity as a result of organ physiological function, besides enzyme synthesis rate, protein stabilization, or modulation of CYP1A enzyme activity of each organ (Leggieri et al., 2019). Our results corroborate the findings concerning the organ-specific differences in CYP1A induction previously described in the gills and liver of *Oncorhynchus mykiss* (Jönsson et al., 2006; Leggieri et al., 2019), kidney of *Sparus aurata* (Ortiz-Delgado et al., 2008), brain of *Cyprinus carpio* (Li et al., 2016), and other zebrafish organs (Oh et al., 2008).

The liver demonstrated an interesting pattern of *cyp1a* transcription over time after B[a]P injection: a nonsymmetrical bell-shaped kinetic with maximum induction at 24 h and a lower but significant induction at 6 and 96 h. The liver is the primary site of *cyp1a* expression in non-exposed teleost fish, playing an important role in the metabolic fate of chemicals (Oh et al., 2008; Uno et al., 2012). Additionally, the liver showed fast EROD activity induction at 6 h and the highest basal values of EROD activity. These findings support the central role of this organ in xenobiotic biotransformation. Nevertheless, as the EROD returned to basal levels at 24 h, the bell-shaped transcription kinetic seems to indicate that the liver constitutive CYP1A enzyme activity delays the transcription as the B[a]P is readily metabolized by the hepatocytes.

After intraperitoneal injection of B[a]P, the increase in EROD activity occurred rapidly in the liver and kidney compared to the other organs tested, indicating the critical role of these organs during metabolization and excretion of organic xenobiotics in *P. lineatus*. These findings are consistent with the significant increase in B[a]P concentration in bile observed at 6 h after injection, as xenobiotics and/or their metabolites can be transported into the gallbladder for further excretion through the gastrointestinal tract. Alternatively, xenobiotics and their metabolites can be transported into the bloodstream, promoting their renal excretion (Luckenbach et al., 2014). The renal mechanisms of glomerular ultrafiltration and active tubular secretion contribute to the excretion of organic chemicals by the kidney (Wright and Dantzler, 2004), and the importance of this mechanism of excretion in *P. lineatus* is reinforced by the fact that the kidney is the only organ where EROD activity remained significantly increased during the three experimental times.

The transcription and activity levels of CYP1A reached their maximum peaks at 6 h in the kidney, with a reduction at longer exposure times, without returning to basal levels. Meanwhile, the liver, while not showing coincident transcription and maximum activity levels, also depicted a reduction at the end of the exposure period in both parameters. These reductions are directly related to the B[a]P biotransformation, as supported by the decrease in the concentration of B[a]P in bile over the experimental times. Furthermore, other organs were involved in biotransformation at 24 h after B[a]P injection, such as the gills and brain. Taken together, these results endorse similar results to those previously reported in *Gadus morhua*, which showed rapid hepatic uptake and response after exposure to crude oil, followed by an initial increase in bile metabolites and continued decrease over the experimental time (Aas et al., 2000a). In addition, the high capacity of *cyp1a* induction in the kidney was also demonstrated in the renal tissue of *Salmo salar* which showed the highest potential of *cyp1a* induction from basal levels (Rees et al. 2003).

Although EROD response in the liver and kidney was more rapid, our results also point to an important metabolic capacity of the gills, as the EROD activity in this organ showed a significant increase only at 24 h. However, the range of this response was the most prominent. Fish gill is a morphologically and functionally complex organ involved in gas exchange, osmoregulation, acid-base balance, ammonia excretion, modification of circulating metabolites, and other physiological processes (Evans et al., 2005). As the gill tissue has a large highly vascularized surface area to enable gas exchange and directly receives all the blood flow from the heart, the molecules present in the venous effluent from the body tissues may interfere with the branchial cellular mechanisms (Olson, 1998; Rees et al., 2003). Therefore, the gills are one of the three main sites of biotransformation in fish based on the concentration of enzymes involved in the process, combined with the liver and gastrointestinal tract (Tierney et al., 2013). A previous study in our laboratory showed a significant increase in EROD activity in the gills after a single intraperitoneal injection of B[a]P, and after 24 h the activity was higher than the values observed in the liver (Santos et al., 2018). In addition, previous studies comparing specific tissue responses of CYP1A to HPAs given by injection or by water exposure demonstrated the highest induction of EROD activity in the gills (Doering et al., 2012). Consequently, the activity of CYP1A in the gills reflects its determinant function in

biotransformation of xenobiotics present in water and also as a relevant secondary route for ingested compounds (Rees et al., 2003). The fact that branchial transcription induction and EROD activity did not demonstrate any significant changes 96 h after the injection of B[a]P, indicates that the gills of *P. lineatus* present sensitivity to circulating compounds, which immediately returned to basal values when the concentration of B[a]P decreased.

On the other hand, our findings point to a substantial metabolic capacity of the brain of *P. lineatus*, given the strong induction of *cyp1a* at all times, despite the fact that the induction of EROD activity in the brain occurred later than in the liver and kidney. From the mapping of CYP protein expression through the brain cell regions, it has been shown that the levels of expression vary greatly between the regions, but at the cellular level the expression can be as high as in the hepatocytes (Miksys and Tyndale, 2013). In fact, the widespread distribution of AhR in the brain (Juricek and Coumoul, 2018) enables the induction of *cyp1a* via the AhR receptor. However, in vertebrates there is rigid control in the molecular movement between the blood and the central nervous system in order to protect the brain from potentially neurotoxic compounds and avoid exposure to physiological fluctuations of plasma solutes. Thus, the movement of molecules is restricted by anatomical interfaces such as the blood-brain barrier, with tight junctions between cells, which prevents the paracellular flow of molecules and allows the active transport of essential compounds through membrane carriers (Luckenbach et al., 2014). It is possible that the efficiency of the blood-brain barrier protects the brain against the initial entry of xenobiotics, and thus its response to B[a]P is slower, as can be observed by the continuous and gradual increase in the transcription of *cyp1a* up to 96 h and the increase in EROD activity only after 24 h, even when the transcription and activity were already decreasing in the liver and gills. In this context, the transcription of *cyp1a* is most elevated in the brain because the organ possesses the enzymes necessary for the biotransformation, but the entry of foreign compounds is highly regulated, generating an exacerbated response when the barrier does not work. Our finding could add information about the role of the brain during integrate biotransformation patterns in fish, since conflicting results can be found in the literature. In contrast to our results, Kim et al. (2008) observed that brain *cyp1a* induction in *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to β -naphthoflavone increased significantly from 6 h of exposure, with expression levels decreasing after 48 and 96 h. However, Li et al. (2016) describe

that long-term exposure to tributyltin could lead to physiological–biochemical responses based on EROD activity and CYP450 1 family gene expression.

Biotransformation by the CYPs does not always result in the detoxification of a chemical. In relation to PAHs, CYP activity leads to the production of a number of toxic and highly reactive compounds, such as electrophilic diol epoxides (BPDE), which demonstrate genotoxic and carcinogenic properties (Ewa and Danuta, 2017). Thus, the GSTs contribute to the general detoxification scheme through the catalytic binding of GSH with an array of either endogenous or exogenous compounds, including the BPDEs (Dasari et al., 2018); therefore, induction of GST activity has been widely used as an environmental biomarker. In this study, however, no significant increase in GST activity was observed in any organ at any experimental time; in fact, hepatic GST activity presented a significant decrease 96 h after the B[a]P injection. A decrease in liver GST activity associated with a significant increase in lipid peroxidation was reported in *Clarias gariepinus* exposed to different types of hydrocarbons for 96 h (Otitoloju and Olagoke, 2011). In contrast, our results did not demonstrate any changes in lipid peroxidation. On the other hand, the increase in EROD activity and GST activity after an intraperitoneal injection of PAHs was previously described in *Sparus aurata* (Banni et al., 2009) and *Carassius auratus* (Lu et al., 2009). As the maintenance of GST activity in *P. lineatus* organs after B[a]P injection has already been demonstrated in another study of our laboratory (Santos et al., 2018), we might suggest that the GST route is not the most important pathway for the inactivation of B[a]P metabolites in *P. lineatus*. For this fish species, the PAH metabolites may be conjugated with glucuronic or sulphuric acids by the action of UDP-glucuronosyl transferases (UGT) and sulphotransferase (SULT), respectively, and the resulting polar metabolites excreted in the urine or secreted into the bile for elimination through the gastrointestinal tract (Collier et al., 2014). Furthermore, inhibition of an isoenzyme of the GST family in humans by a B[a]P metabolite has been reported, indicating that some oxidative products may reduce GST activity (Srivastava et al., 1999).

Transitory lower levels of nonprotein thiols were observed in the liver at 6 and 96 h after the B[a]P injection. GSH is the main nonprotein thiol and it constitutes an efficient non-enzymatic antioxidant that acts both in the direct neutralization of pro-oxidant compounds and as a substrate for GST and other antioxidant enzymes (Lushchak, 2016). The generation of metabolites and ROS by phase I may have

caused these significant decreases in GSH concentration due to its action as an antioxidant. This hypothesis is also supported by the lack of lipid peroxidation in the liver. At 96 h after B[a]P injection there was another significant decrease in hepatic GSH concentration, although EROD activity had reached basal values. It is worth integrating this 96h reduction in GSH and the decrease in GST activity that occurred only during this experimental time, since GSH, an essential cofactor for GST, may be recruited as a non-enzymatic antioxidant or used by antioxidant enzymes. Thus, the availability of GSH for conjugation with the phase I metabolites was reduced, which may result in the decrease in GST activity at 96 h. GSH depletion has been found to play an important role in the toxicity of PAHs, as demonstrated by Yazdani (2018) in rainbow trout hepatocytes *in vitro* exposed to PAHs, including B[a]P, suggesting that some level of oxidative stress occurred.

The B[a]P concentrations found in bile indicate the presence of xenobiotics in the body, and the strong negative correlation between the experimental time and the concentration values points to the metabolization of the original compound into intermediate metabolites. B[a]P metabolites formed during phase I, as well as the non-biotransformed compound, can be secreted into the gallbladder through ABC type efflux transporters, located in the cellular membranes of the hepatic ducts. These same transporters are responsible for moving the xenobiotic and its metabolites into the bloodstream, favoring excretion through the urine (Luckenbach et al., 2014). As bile is a digestive secretion, the elimination of compounds by this route is directly linked to the food status of the organism (Aas et al., 2000a), therefore, as the animals were not fed during the experiment, the elimination of B[a]P through bile could have been greater.

All the organs tested in this work presented a response to the organic contaminant, through different exposure routes, suggesting free circulation of the xenobiotic through the fish body. In fact, the blood circulation itself may be responsible for the integrated response of the biotransformation mechanisms in the different organs studied, redistributing the xenobiotic and its metabolites, associated with the action of ABC transporters. Despite the known presence of ABC transporters in fish membranes, their specific mechanism needs to be further studied in *P. lineatus*.

Conclusions

The induction of biotransformation mechanisms in *P. lineatus* presents organ-specific characteristics, where the gills, liver, brain, and kidney present distinct kinetic responses over time. The *cyp1a* gene transcription proved to be relevant to understand the role of each organ in the biotransformation mechanism of *P. lineatus*, characterizing the integrated organism responses to the circulation of the xenobiotic and its metabolites through the bloodstream. The EROD activity showed a rapid response in the liver and kidney, reinforcing the role of these organs in the biotransformation and excretion of xenobiotics. The gills showed a slower response in the EROD activity, but the amplitude of the response confirms its importance in the mechanism of detoxification in *P. lineatus*. The brain, usually protected by the blood-brain barrier, showed a slower response to the presence of the xenobiotic. Despite the high activity of phase I biotransformation, there was no increase in GST activity, indicating the occurrence of phase II biotransformation by other enzymatic pathways. The absence of LPO and the GSH reduction in the liver demonstrate the antioxidant capacity of this organ. The presence of B[a]P in the bile confirms the efflux of xenobiotics to be excreted, which can contribute to the redistribution by the bloodstream. In the future, further studies concerning the mechanisms involved in biotransformation in *P. lineatus*, including the expression and activity dynamics of other enzymes, may add valuable information to understand xenobiotic metabolism in different organs of the Neotropical fish *P. lineatus*.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. This work is part of the PhD thesis of C. Santos, who received a scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). C. B. R. Martinez (Process 307947/2015-7) is a research fellow of the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O.K., 2000a. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk

- parameters for chronic oil exposure a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquat. Toxicol.* 51, 241–258. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00108-9)
- Aas, E., Beyer, J., Goksøyr, A., 2000b. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* 5, 9–23. <https://doi.org/10.1080/135475000230505>
- Aranda, P.S., LaJoie, D.M., Jorcyk, C.L., 2012. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing rna quality. *Natl. Institutes Heal.* 33, 366–369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Ashauer, R., Jager, T., 2018. Physiological modes of action across species and toxicants: The key to predictive ecotoxicology. *Environ. Sci. Process. Impacts* 20, 48–57. <https://doi.org/10.1039/c7em00328e>
- Banni, M., Bouraoui, Z., Ghedira, J., Clerandau, C., Guerbej, H., Narbonne, J.F., Boussetta, H., 2009. Acute effects of benzo[a]pyrene on liver phase I and II enzymes, and DNA damage on sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 293–299. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9210-9>
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882–888.
- Bielen, A., Bošnjak, I., Sepčić, K., Jaklič, M., Cvitanić, M., Lušić, J., Lajtner, J., Simčić, T., Hudina, S., 2016. Differences in tolerance to anthropogenic stress between invasive and native bivalves. *Sci. Total Environ.* 543, 449–459. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.049>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Budinsky, R.A., Schrenk, D., Simon, T., Van Den Berg, M., Reichard, J.F., Silkworth, J.B., Aylward, L.L., Brix, A., Gasiewicz, T., Kaminski, N., Perdew, G., Starr, T.B., Walker, N.J., Rowlands, J.C., 2014. Mode of action and dose-response framework analysis for receptor-mediated toxicity: The aryl hydrocarbon receptor as a case study. *Crit. Rev. Toxicol.* 44, 83–119. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.835787>
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M., 1998. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. *Methods Mol. Biol.* 108, 377–387. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:377>

- Chiaro, C.R., Patel, R.D., Marcus, C.B., Perdew, G.H., 2007. Evidence for an aryl hydrocarbon receptor-mediated cytochrome P450 autoregulatory pathway. *Mol. Pharmacol.* 72, 1369–1379. <https://doi.org/10.1124/mol.107.038968>
- Collier, T.K., Anulacion, B.F., Arkoosh, M.R., Dietrich, J.P., Incardona, J.P., Johnson, L.L., Myers, M.S., 2014. Effects on fish of polycyclic aromatic exposures, *Fish Physiology: Organic Chemical Toxicology of Fishes*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398254-4.00004-2>
- Dasari, S., Ganjavi, M.S., Yellanurkonda, P., Basha, S., Meriga, B., 2018. Role of glutathione S-transferases in detoxification of a polycyclic aromatic hydrocarbon, methylcholanthrene. *Chem. Biol. Interact.* 294, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.023>
- Doering, J.A., Wiseman, S., Beitel, S.C., Tendler, B.J., Giesy, J.P., Hecker, M., 2012. Tissue specificity of aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated responses and relative sensitivity of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to an AhR agonist. *Aquat. Toxicol.* 114–115, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.015>
- Eggers, M.L., Galgani, F., 1992. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: Fast determination with a fluorescence plate-reader. *Mar. Environ. Res.* 33, 213–221. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(92\)90149-G](https://doi.org/10.1016/0141-1136(92)90149-G)
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol. Rev.* 85, 97–177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>
- Ewa, B., Danuta, M.Š., 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J. Appl. Genet.* 58, 321–330. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>
- Filho, V.A.M., Freitas, M. V., Ariede, R.B., Lira, L.V.G., Mendes, N.J., Hashimoto, D.T., 2018. Genetic Applications in the Conservation of Neotropical Freshwater Fish, in: Ray, S. (Ed.), *Biological Resources of Water*. IntechOpen, pp. 249–284. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73207>
- Fiorelini Pereira, B., Alves, A.L., Senhorini, J.A., Hakime Scalize, P., Tocchini De Figueiredo, F.A., Pitol, D.L., Caetano, F.H., 2017. Quantifying structural modifications of gills of two fish species *Astyanax altiparanae* (Lambari) and *Prochilodus lineatus* (Curimatá) after exposure to biodegradable detergents in

- urban lake water. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 80, 338–348. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1323254>
- Freitas, E.C., Rocha, O., 2011. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: The importance of using native species as test organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 241–249. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9541-2>
- Furley, T.H., Brodeur, J., Silva de Assis, H.C., Carriquiriborde, P., Chagas, K.R., Corrales, J., Denadai, M., Fuchs, J., Mascarenhas, R., Miglioranza, K.S.B., Miguez Caramés, D.M., Navas, J.M., Nugegoda, D., Planes, E., Rodriguez-Jorquera, I.A., Orozco-Medina, M., Boxall, A.B.A., Rudd, M.A., Brooks, B.W., 2018. Toward sustainable environmental quality: Identifying priority research questions for Latin America. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 14, 344–357. <https://doi.org/10.1002/ieam.2023>
- Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., Kovacevic, R., Smital, T., 2015. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 158, 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.013>
- Jönsson, E.M., Abrahamson, A., Brunström, B., Brandt, I., 2006. Cytochrome P4501A induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzo[a]pyrene and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Aquat. Toxicol.* 79, 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.006>
- Juricek, L., Coumoul, X., 2018. The aryl hydrocarbon receptor and the nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2504. <https://doi.org/10.3390/ijms19092504>
- Karr, J.R., 1981. Assessment of biotic integrity using fish communities. *Fisheries* 6, 21–27. [https://doi.org/10.1577/1548-8446\(1981\)006<0021:aobiuf>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(1981)006<0021:aobiuf>2.0.co;2)
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.
- Kim, J., Hwang, D., Son, K., Raisuddin, S., Ki, J., Lee, J., Han, K., 2008. cDNA Cloning and expression of a xenobiotic metabolizing cytochrome P4501A (CYP1A) from the Yellow Catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* (Siluriformes). *Environ. Toxicol.* 23, 346–353. <https://doi.org/10.1002/tox.20333>
- Koglin, S., Kammann, U., Eichbaum, K., Reininghaus, M., Eisner, B., Wiseman, S., Hecker, M., Buchinger, S., Reifferscheid, G., Hollert, H., Brinkmann, M., 2016. Toward understanding the impacts of sediment contamination on a native fish

- species: transcriptional effects, EROD activity, and biliary PAH metabolites. *Environ. Sci. Eur.* 28, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0096-3>
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., Coumoul, X., 2018. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2018.05.001>
- Lee, J.W., Yoon, H.G., Lee, S.K., 2015. Benzo(a)pyrene-induced cytochrome p4501A expression of four freshwater fishes (*Oryzias latipes*, *Danio rerio*, *Cyprinus carpio*, and *Zacco platypus*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 1041–1050. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.03.010>
- Leggieri, L.R., De Anna, J.S., Cárcamo, J.G., Cerón, G.A., Darraz, L.A., Panebianco, A., Luquet, C.M., 2019. Gills CYP1A of *Oncorhynchus mykiss* as a sensitive biomarker of crude oil pollution in freshwater environments. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 67, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.01.008>
- Li, Z.H., Zhong, L.Q., Wu, Y.H., Mu, W.N., 2016. Alteration of cytochrome P450 1 regulation and HSP 70 level in brain of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) after chronic exposure to tributyltin. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 287–294. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0136-8>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, G.H., Wang, C., Zhu, Z., 2009. The dose-response relationships for EROD and GST induced by polyaromatic hydrocarbons in *Carassius auratus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 194–199. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9622-3>
- Luckenbach, T., Fischer, S., Sturm, A., 2014. Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 165, 28–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.05.002>
- Lushchak, V.I., 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 711–747. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5>
- Martins, S.E., Bianchini, A., 2011. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. *J. Environ. Monit.* 13, 1866. <https://doi.org/10.1039/c0em00787k>
- Miksys, S., Tyndale, R.F., 2013. Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. *J. Psychiatry Neurosci.* 38, 152–163. <https://doi.org/10.1503/jpn.120133>

- Oh, S.-M., Ryu, B.T., Kim, H.R., Choi, K., Chung, K.-H., 2008. Molecular cloning of cyp1a gene and its expression by benzo(a)pyrene from goldfish (*Carassius auratus*). *Environ. Toxicol.* 24, 225–234. <https://doi.org/10.1002/tox.20422>
- Olson, K.R., 1998. Hormone metabolism by the fish gill. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 119, 55–65. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(97\)00406-6](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(97)00406-6)
- Ortiz-Delgado, J.B., Behrens, A., Segner, H., Sarasquete, C., 2008. Tissue-specific induction of EROD activity and CYP1A protein in *Sparus aurata* exposed to B(a)P and TCDD. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.12.021>
- Otitoloju, A., Olagoke, O., 2011. Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in *Clarias gariepinus* as useful biomarkers for monitoring exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Monit. Assess.* 182, 205–213. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1870-0>
- Pampanin, D.M., Le Goff, J., Skogland, K., Marcucci, C.R., Øysæd, K.B., Lorentzen, M., Jørgensen, K.B., Sydnes, M.O., 2016. Biological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their first metabolic products in in vivo exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 79, 633–646. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1171993>
- Piña, B., Casado, M., Quirós, L., 2007. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26, 1145–1154. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.009>
- Qian, X., Ba, Y., Zhuang, Q., Zhong, G., 2014. RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics. *Omi. A J. Integr. Biol.* 18, 98–110. <https://doi.org/10.1089/omi.2013.0110>
- Rees, C.B., McCormick, S.D., Vanden Heuvel, J.P., Li, W., 2003. Quantitative PCR analysis of CYP1A induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* 62, 67–78. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00062-0)
- Rey-Salgueiro, L., Costa, J., Ferreira, M., Reis-Henriques, M.A., 2011. Evaluation of 3-hydroxy-benzo[a]pyrene levels in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after waterborne exposure to Benzo[a]pyrene. *Toxicol. Environ. Chem.* 93, 2040–2054. <https://doi.org/10.1080/02772248.2011.606108>
- Sadauskas-Henrique, H., Duarte, R.M., Gagnon, M.M., Almeida-Val, V.M.F., 2017. Validation of a suite of biomarkers of fish health in the tropical bioindicator

- species, tambaqui (*Colossoma macropomum*). Ecol. Indic. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.10.010>
- Santos-Silva, T.G., Montagner, C.C., Martinez, C.B.R., 2018. Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 58, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.02.002>
- Santos, C., de Oliveira, M.T., Cólus, I.M. de S., Sofia, S.H., Martinez, C.B. dos R., 2018. Expression of *cyp1a* induced by benzo(A)pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 61, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.05.008>
- Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Ecotoxicology 20, 1400–1410. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0697-y>
- Srivastava, S.K., Hu, X., Xia, H., Awasthi, S., Amin, S., Singh, S. V., 1999. Metabolic fate of glutathione conjugate of benzo[a]pyrene-(7R,8S)-diol (9S,10R)-epoxide in human liver. Arch. Biochem. Biophys. 371, 340–344. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1475>
- Tierney, K.B., Kennedy, C.J., Gobas, F., Gledhill, M., Sekela, M., 2013. Organic Contaminants and Fish. In: Tierney, K. B.; Farrell, A. P.; Brauner, C. J. (Eds.), Fish Physiology. Academic Press, pp. 1-52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398254-4.00001-7>
- Uno, T., Ishizuka, M., Itakura, T., 2012. Cytochrome P450 (CYP) in fish. Environ. Toxicol. P 34, 1–13. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.etap.2012.02.004>
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Vieira, C.E.D., Martinez, C.B. dos R., 2018. The pyrethroid Λ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. Chemosphere 210, 958–967. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.115>
- Wright, S.H., Dantzler, W.H., 2004. Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. Physiol. Rev. 84, 987–1049.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2003>

- Yazdani, M., 2018. Comparative toxicity of selected PAHs in rainbow trout hepatocytes: genotoxicity, oxidative stress and cytotoxicity. *Drug Chem. Toxicol.* 0, 1–8. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1497054>
- Yuan, L., Lv, B., Zha, J., Wang, Z., Wang, W., Li, W., Zhu, L., 2013. New cytochrome P450 1B1, 1C1, 2Aa, 2Y3, and 2K genes from Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*): Molecular characterization, basal expression and response of rare minnow CYP1s and CYP2s mRNA exposed to the AHR agonist benzo[a]pyrene. *Chemosphere* 93, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.064>
- Zhang, W., Xie, H.Q., Zou, X., Li, J., Xu, L., Li, Y., Zhou, Z., Jin, T., Ma, D., Zhao, B., 2019. The toxic effects of in situ exposure of a native fish species (*Anabas testudineus*) to electronic waste pollution. *Sci. Total Environ.* 690, 1170–1177. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.479>

CAPÍTULO 3

Mecanismo de resistência a multixenobióticos: características órgão-específicas no peixe *Prochilodus lineatus* e seu papel na proteção contra agentes genotóxicos

Caroline Santos; Claudia Bueno dos Reis Martinez

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*

Guide for Authors: <https://www.elsevier.com/journals/comparative-biochemistry-and-physiology-part-c-toxicology-and-pharmacology/1532-0456/guide-for-authors>

Mecanismo de resistência a multixenobióticos: características órgão-específicas no peixe *Prochilodus lineatus* e seu papel na proteção contra agentes genotóxicos

Caroline Santos; Claudia Bueno dos Reis Martinez

Laboratório de Ecofisiologia Animal – Universidade Estadual de Londrina – Londrina, Paraná, Brasil

Autor correspondente – Telefone: +55-43-33715146; E-mail: cbueno@uel.br

Resumo

Danos no DNA podem ser causados pela ação direta de xenobióticos ou pelos metabólitos intermediários e espécies reativas de oxigênio gerados durante a biotransformação. O mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR), pode diminuir a pressão genotóxica intracelular através do efluxo dos compostos para o meio extracelular. Assim, o presente trabalho apresenta uma abordagem temporal sobre a atividade da MXR e a ocorrência de danos genotóxicos em diferentes órgãos do peixe *Prochilodus lineatus* após uma injeção intraperitoneal de benzo[a]pireno (B[a]P). O fígado e o cérebro apresentaram uma rápida indução na MXR (6 h), mas a ocorrência de danos no DNA não foi impedida. Porém, os dois órgãos demonstraram algum retorno na integridade do DNA após a atividade da MXR. O rim demonstrou uma resposta mais lenta na indução da MXR (24 h), que pode estar relacionada com a excreção preferencial de metabólitos de HPAs por essa via. Assim, a redução na MXR observada no rim em 96 h pode estar relacionada com o seu papel na excreção de metabólitos advindos de todos os demais órgãos metabolizadores. As brânquias não parecem desempenhar um papel importante no efluxo de xenobióticos em *P. lineatus*, mas sua participação na biotransformação pode ser observada pela ocorrência de danos no DNA. A resposta integrada dos órgãos na dinâmica de manutenção da integridade do organismo pode ser promovida pela circulação do xenobiótico pela corrente sanguínea, o que corrobora com o aumento nos dados no DNA nos eritrócitos em 6 h. A habilidade de indução da MXR está ligada à manutenção da integridade do DNA na presença de B[a]P, uma vez que a MXR atua para evitar o acúmulo do xenobiótico no interior celular.

Palavras-chave: benzo[a]pireno; ensaio do cometa; acúmulo de rodamina

1 Introdução

Os ecossistemas aquáticos recebem constantemente resíduos de origem antropogênica, o que resulta na exposição da biota a uma série de compostos químicos com potencial deletério (Häder et al., 2020; Logeshwaran et al., 2018; Mushtaq et al., 2020). Entre o conjunto de estratégias de defesa dos organismos aquáticos encontra-se o mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR), responsável pelo efluxo e conseqüente diminuição intracelular de compostos potencialmente tóxicos. Esse fenótipo resulta da atividade de transportadores transmembrana pertencentes à superfamília de proteínas do tipo ABC (*ATP-binding cassette*), que por meio da ligação e hidrólise do ATP obtêm energia para o transporte de substratos através das membranas celulares (Bard, 2000; Epel et al., 2008; Ferreira et al., 2014). De fato, os transportadores ABC apresentam uma ampla distribuição filogenética e podem ser determinantes na tolerância dos organismos aquáticos a ambientes contaminados (Bard, 2000).

As subfamílias de transportadores ABC que atuam no efluxo de xenobióticos e moléculas endógenas foram identificadas em diversas espécies de peixes, com distribuição órgão-específica (Costa et al., 2012; Ferreira et al., 2014; Liu et al., 2016; Lončar et al., 2010; Luckenbach et al., 2014). Porém, muitos estudos abordam a expressão de genes e quantificação de proteínas (Liu et al., 2016; Lončar et al., 2010; Tutundjian et al., 2002), e ainda pouco se sabe sobre a contribuição de alguns órgãos na atividade e funcionalidade da MXR. A resistência ou sensibilidade de uma determinada espécie à poluição local pode estar associada a capacidade de modulação desse mecanismo nos diferentes órgãos do animal. Além disso, a capacidade de indução da MXR pode estar diretamente associada: i) às características ecológicas do organismo; e, ii) à distribuição das espécies nos ambientes impactados pela entrada de contaminantes (Assef et al., 2019; Macêdo et al., 2019), o que destaca a importância de estudos que caracterizem as respostas de organismos representativos da biota local.

De maneira geral, a MXR atua em cooperação com o mecanismo de biotransformação de xenobióticos, que em conjunto desempenham um papel essencial na detoxificação do organismo e na manutenção da integridade das estruturas celulares na presença de um composto potencialmente tóxico (Bard, 2000; Epel et al., 2008; Ferreira et al., 2014). A biotransformação consiste num

processo celular enzimático que altera a molécula dos xenobióticos lipofílicos para metabólitos mais hidrofílicos de maior afinidade com o sistema de excreção. A biotransformação é dividida em fase I, na qual enzimas do citocromo P450 catalisam principalmente reações de oxidação, redução e hidrólise, e fase II, em que enzimas transferases catalisam a ligação de cofatores endógenos ao xenobiótico ou aos metabólitos intermediários oriundos da fase I (Tierney et al., 2013; Van der Oost et al., 2003). Além disso, os transportadores ABC fazem o efluxo do xenobiótico e seus metabólitos através da membrana, o que caracteriza a fase III de biotransformação (Bard, 2000; Epel et al., 2008; Ferreira et al., 2014).

Como resultado da atuação do mecanismo de biotransformação pode ocorrer a formação de moléculas altamente reativas, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e, dependendo do composto, a formação de metabólitos intermediários altamente tóxicos. As ERO induzem a oxidação de componentes celulares, como lipídios, proteínas e a molécula de DNA (Lushchak, 2016). Neste contexto, os danos no DNA podem ser causados pelo xenobiótico e seus metabólitos gerados durante a biotransformação e pelas ERO (Chatterjee and Walker, 2017). Considerando-se a importância da molécula de DNA na manutenção do metabolismo celular, os organismos possuem um sofisticado sistema de reparo de danos no DNA, cuja expressão apresenta variação tecido-específica de acordo com o tipo celular e o metabolismo de cada órgão (Ali et al., 2009; Kienzler et al., 2013; Mohanty et al., 2011).

Benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) é um dos hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) mais estudados pelo seu potencial mutagênico e carcinogênico (Ewa and Danuta, 2017). B[*a*]P é um conhecido indutor das enzimas fase I e II (Budinsky et al., 2014; Chiaro et al., 2007; Juricek and Coumoul, 2018; Larigot et al., 2018) e possivelmente o transporte do composto e/ou seus metabólitos ocorra através dos transportadores ABC. Este composto não é carcinogênico em si, mas após a fase I da biotransformação são gerados uma série de compostos intermediários eletrofílicos tóxicos e altamente reativos, como os dióis epóxidos (BPDEs). Estes intermediários provocam danos genotóxicos pela formação de adutos de DNA, o que pode iniciar o processo de mutagênese e carcinogênese (Chatterjee and Walker, 2017; Schlenk et al., 2008).

Já foi demonstrado que a indução do mecanismo de biotransformação no peixe Neotropical *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) apresenta características

órgão-específicas e a dinâmica de indução de danos no DNA pode ocorrer de maneira distinta dependendo do órgão afetado (Santos et al., 2018). Além disso, a resposta integrada de diferentes órgãos pode estar diretamente ligada ao efluxo de xenobióticos pelos órgãos metabolizadores e redistribuição através da corrente sanguínea, onde a cinética de resposta pode estar relacionada com as funções fisiológicas exercidas por cada órgão (Santos; Martinez, 2020). Apesar de existirem informações sobre a atividade dos hepatócitos na biotransformação de xenobióticos e no mecanismo MXR do peixe *P. lineatus* associadas as possíveis alterações nas estruturas celulares como lipoperoxidação e danos no DNA (Liebel et al., 2011), pouco se sabe sobre a participação de outros órgãos como as brânquias, cérebro e rim nessa dinâmica.

Desta forma, considerando-se que a MXR pode diminuir a pressão genotóxica no meio intracelular, o presente trabalho apresenta uma abordagem temporal na avaliação do mecanismo MXR e na ocorrência de danos genotóxicos em diferentes órgãos do peixe *P. lineatus* após uma única injeção intraperitoneal de B[a]P, a fim de elucidar a integração dos órgãos na dinâmica de biotransformação e manutenção da integridade do organismo. A partir das observações sobre as características órgão-específicas da biotransformação em *P. lineatus* contidas no estudo de Santos e Martinez (2020), o presente trabalho visou responder à pergunta: as características órgão-específicas no efluxo de compostos influenciam na cinética de danos no DNA e favorecem uma atuação coordenada dos mecanismos de biotransformação do organismo?

2 Material e Métodos

2.1 Procedimentos experimentais

Juvenis de *P. lineatus* ($13,98 \pm 0,19$ cm; $56,02 \pm 2,37$ g; média \pm SE), obtidos em pisciculturas locais, foram aclimatados durante sete dias no laboratório, em tanques de 500 L contendo água limpa e desclorada com aeração constante, e fotoperíodo definido a 12: 12 h (claro: escuro). Os parâmetros físicos e químicos da água foram mensurados durante a aclimação e se mantiveram constantes ($25,39 \pm 0,33$ °C; pH $7,7 \pm 0,10$; $6,90 \pm 0,17$ mg O₂ L⁻¹; condutividade: $2,83 \pm 0,21$ mS cm⁻¹). Os animais foram alimentados a cada 48 h com ração para peixes contendo 36% de proteína (Guabi, Brasil), e a alimentação foi suspensa 24 h antes do início dos

experimentos. Após o período de aclimatação, os animais foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e divididos em dois grupos: os peixes do grupo experimental (B[a]P) receberam uma única injeção intraperitoneal de benzo[a]pireno ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}$ - Sigma Aldrich, Brasil), dissolvido em óleo de canola na dose de 20 mg kg^{-1} . Os animais do grupo do óleo (OIL) receberam apenas uma dose do veículo no mesmo volume utilizado para o grupo experimental (1 mL kg^{-1}). A dose de B[a]P e o uso de óleo de canola como veículo foi definida no trabalho de Santos et al. (2018). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (Processo nº 6625.2017.37).

Após a injeção, os peixes foram transferidos para aquários de 50 L contendo água limpa e desclorada, contendo cinco animais em cada aquário e duas réplicas por grupo ($n = 5$ por réplica; $n = 10$ por grupo), onde permaneceram por diferentes períodos (6, 24 ou 96 h). Foram realizados experimentos independentes para cada período. Transcorrido o tempo experimental, os peixes foram anestesiados em benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), para a retirada do sangue. Imediatamente após amostragem, foram utilizadas amostras de sangue para determinar os parâmetros hematológicos e uma alíquota ($10 \mu\text{L}$) foi armazenada em soro bovino fetal (GIBCO – Invitrogen) para análise de danos no DNA. Logo em seguida, os peixes foram mortos por secção medular para a remoção das brânquias, fígado, cérebro e rim. Os órgãos foram divididos em duas partes, uma parte foi imersa em soro bovino fetal (GIBCO – Invitrogen) para dissociação e análise de danos no DNA. A outra parte do órgão foi mantida à seco em microtubos individuais para análise da MXR. Todas as amostras permaneceram refrigeradas à 4°C até o momento das análises.

2.2 Parâmetros hematológicos

O hematócrito (Hct) foi determinado a partir da centrifugação do sangue em um microcapilar (1200 g , 7 min) e as leituras foram realizadas usando um cartão padronizado. O número de células vermelhas por mm^3 de sangue (RBC) foi contado em câmara de Neubauer em microscópio de luz. O conteúdo de hemoglobina (Hb) foi estimado pelo método colorimétrico da cianometemoglobina (Labtest Diagnostica, Brasil), em espectrofotômetro a 540 nm .

2.3 Atividade da MXR – Ensaio do acúmulo de rodamina B

Para avaliar o mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR), foi realizado o ensaio de acúmulo de rodamina B de acordo com Kurelec et al. (2000), com modificações para órgãos de peixes. Neste ensaio, mede-se o nível de acúmulo de um substrato modelo dos transportadores ABC, o corante fluorescente rodamina B. O aumento da fluorescência no órgão representa uma redução da MXR, uma vez que a rodamina B entra facilmente nas células e seu efluxo é realizado através dos transportadores ABC responsáveis pela MXR. Após a amostragem, os órgãos foram mantidos numa solução de rodamina B (2,5 μM) em solução salina para peixes (126,6 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,5 mM CaCl_2 ; 3,7 mM NaHCO_3 ; 8,9 mM Na_2HPO_4 ; 2,9 mM NaH_2PO_4), durante 2 h sob constante agitação e protegidos da luz direta. Após este período, os órgãos foram lavados 3 vezes em solução salina, homogeneizados no sonicador em água destilada (1: 7 m/ v) e centrifugados (1700 \times g, 7 min, 4 °C). A fluorescência correspondente à rodamina B acumulada foi medida em espectrofluorímetro (ex/ em 544/ 590 nm) e as concentrações foram determinadas a partir de uma curva padrão de rodamina B. Os dados foram expressos em μmol rodamina mg proteína⁻¹.

A concentração de proteínas totais utilizada para normalizar os dados foi determinada pelo método de Bradford (1976), baseado na reação das proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich, Brasil) e determinada a 595 nm.

2.4 Danos no DNA

A dissociação dos órgãos foi elaborada a partir de Guilherme et al. (2012) com pequenas modificações. As amostras de brânquias, fígado, cérebro e rim foram picotadas com uma tesoura fina em soro bovino fetal, filtradas e as suspensões celulares resultantes foram utilizadas no ensaio do cometa.

O ensaio alcalino do cometa foi realizado com eritrócitos, células branquiais, hepatócitos, células do cérebro e células renais de acordo com Singh et al. (1988), com algumas modificações descritas por Alvim and Martinez (2019). O ensaio do cometa foi realizado exclusivamente em amostras cuja viabilidade celular foi superior a 90%, determinada pelo teste de exclusão do *Trypan blue*.

No momento da análise, as lâminas obtidas foram coradas com GelRed™ (0,03%) (Uniscience, Brasil) e observadas em microscópio de fluorescência (filtro de excitação azul de 450-490 nm e filtro de barreira de 515 nm) na objetiva de 40 x. Foram analisados 100 nucleoides por animal, por meio de teste cego. Os danos foram classificados em quatro classes, considerando-se o tamanho da cauda do cometa, de acordo com Vieira et al. (2016). O escore de danos no DNA foi obtido pela multiplicação do número de células em cada classe pelo valor da classe, variando de 0 (sem danos) à 300 (todos danos de grau 3). Os resultados dos danos no DNA foram expressos pelo valor médio do escore de dano obtido para cada grupo em cada tempo de exposição. Foi realizado o cálculo da frequência média de nucleoides observada em cada classe de cometa (0, 1, 2 e 3), calculada para cada grupo experimental em cada tempo de exposição.

2.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão. Após verificar a normalidade dos dados (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene), as médias obtidas para todas as análises foram comparadas entre os diferentes grupos (OIL X B[a]P), em cada tempo experimental, por meio de análise paramétrica (teste t de Student) ou não paramétrica (Mann-Whitney), de acordo com a distribuição dos dados. Além disso, o teste de Spearman foi aplicado para apontar correlações não lineares entre o escore de danos e o tempo. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

3 Resultados

3.1 Parâmetros hematológicos

Não foi observada ocorrência de alterações hematológicas significativas nos animais avaliados após uma única injeção de B[a]P, nos tempos experimentais de 6, 24 e 96 horas. Os valores médios medidos de Hb, Hct, RBC e estão descritos na Tabela 3.1.

3.2 Atividade da MXR

O aumento no acúmulo de rodamina nos órgãos representa uma menor atividade da MXR. A brânquia foi o único órgão que não apresentou variação

significativa na atividade da MXR (Fig 3.1 A). Em contraste, a MXR foi significativamente maior nos grupos B[a]P, em relação aos respectivos grupos OIL, no fígado, cérebro e rim, em pelo menos um tempo experimental (Fig 3.1). No fígado, a MXR mostrou um aumento significativo em 6 h ($t = 3,512$, $p = 0,003$) e 24 h ($U = 11.000$, $p = 0,054$) após a injeção e retornou à atividade basal em 96 h (Fig 3.1 B). O cérebro apresentou um aumento significativo na MXR em 6 h após a injeção ($U = 12.000$, $p = 0,038$), e retornou à atividade basal após 24 h (Fig 3.1 C). Já o rim apresentou aumento significativo na MXR somente após 24 h ($t = 2,525$, $p = 0,028$) e diminuição significativa após 96 h ($t = -3,010$, $p = 0,009$) (Fig 3.1 D).

3.3 Danos no DNA

O escore de danos de DNA foi significativamente maior no grupo B[a]P, em relação ao grupo OIL, para todos os tipos celulares após pelo menos um tempo experimental (Fig. 3.2). A brânquia foi o único órgão em que as células apresentaram aumento significativo no escore de dano no DNA após os três tempos experimentais: 6 h ($t = -3,023$, $p = 0,008$), 24 h ($U = 19,500$, $p = 0,023$) e 96 h ($t = -2,106$, $p = 0,049$) (Fig. 3.2 A). Além disso, as células branquiais apresentaram uma frequência maior de danos de classe 2 em 24 h ($U = 22.500$, $p = 0,040$) e 96 h ($t = -2,271$, $p = 0,036$) (Fig. 3.3 A) em relação aos respectivos grupos OIL.

O escore de danos no DNA para os hepatócitos do grupo B[a]P foi significativamente maior após 6 h ($t = -2,253$, $p = 0,037$) e 96 h ($t = -2,228$, $p = 0,041$) (Fig. 3.2 B), e em 6 h estas células apresentaram uma frequência significativamente maior de danos de classe 2 ($t = -2,647$, $p = 0,016$) (Fig. 3.3 B).

As células cerebrais apresentaram um aumento do escore de danos em 6 h ($t = -6,206$, $p < 0,001$) e 24 h ($U = 19,500$, $p = 0,041$), mas nenhuma alteração significativa em 96 h (Fig. 3.2 C). Além disso, foi detectada uma maior frequência de danos das classes 2 e 3 nas células cerebrais em 6 h ($t = -6,547$, $p = 0,001$; $U = 30.000$, $p = 0,034$, respectivamente), combinada com uma diminuição significativa na frequência das classes 0 e 1 ($t = 2,288$, $p = 0,034$; $t = 4,643$, $p < 0,001$, respectivamente) (Fig. 3.3 C)

As células renais apresentaram aumento no escore de danos em 6 h ($U = 24.000$, $p = 0,053$) e 96 h ($t = 3,459$, $p = 0,003$) (Fig. 3.2 D), acompanhado do aumento significativo na frequência de danos de classe 2 (6 h: $t = -2,568$, $p = 0,019$; 96 h: $t = -2,338$, $p = 0,031$) nestes dois tempo (Fig. 3.3 D). Já em 24 h não

Tabela 3.1. Valores (Média \pm EP, n = 8-10) de hematócrito (Hct), número de células vermelhas por mm³ de sangue (RBC) e conteúdo de hemoglobina (Hb) de *P. lineatus* após 6, 24 e 96 h da injeção intraperitoneal de B[a]P (20 mg kg⁻¹) ou apenas do veículo (OIL) (p \leq 0,05).

Experimental time		Hb	Hct	RBC
(hours)		(g dL ⁻¹)	(%)	(10 ⁶ cel mm ⁻³)
6	OIL	10,09 \pm 0,44	36,00 \pm 1,10	3,95 \pm 0,58
	B[a]P	10,10 \pm 0,54	33,22 \pm 1,81	3,90 \pm 0,54
24	OIL	9,50 \pm 0,25	43,43 \pm 1,50	2,28 \pm 0,13
	B[a]P	9,73 \pm 0,15	46,43 \pm 1,07	2,55 \pm 0,12
96	OIL	8,15 \pm 0,45	44,25 \pm 1,62	2,88 \pm 0,33
	B[a]P	9,91 \pm 1,30	37,00 \pm 3,55	2,99 \pm 0,21

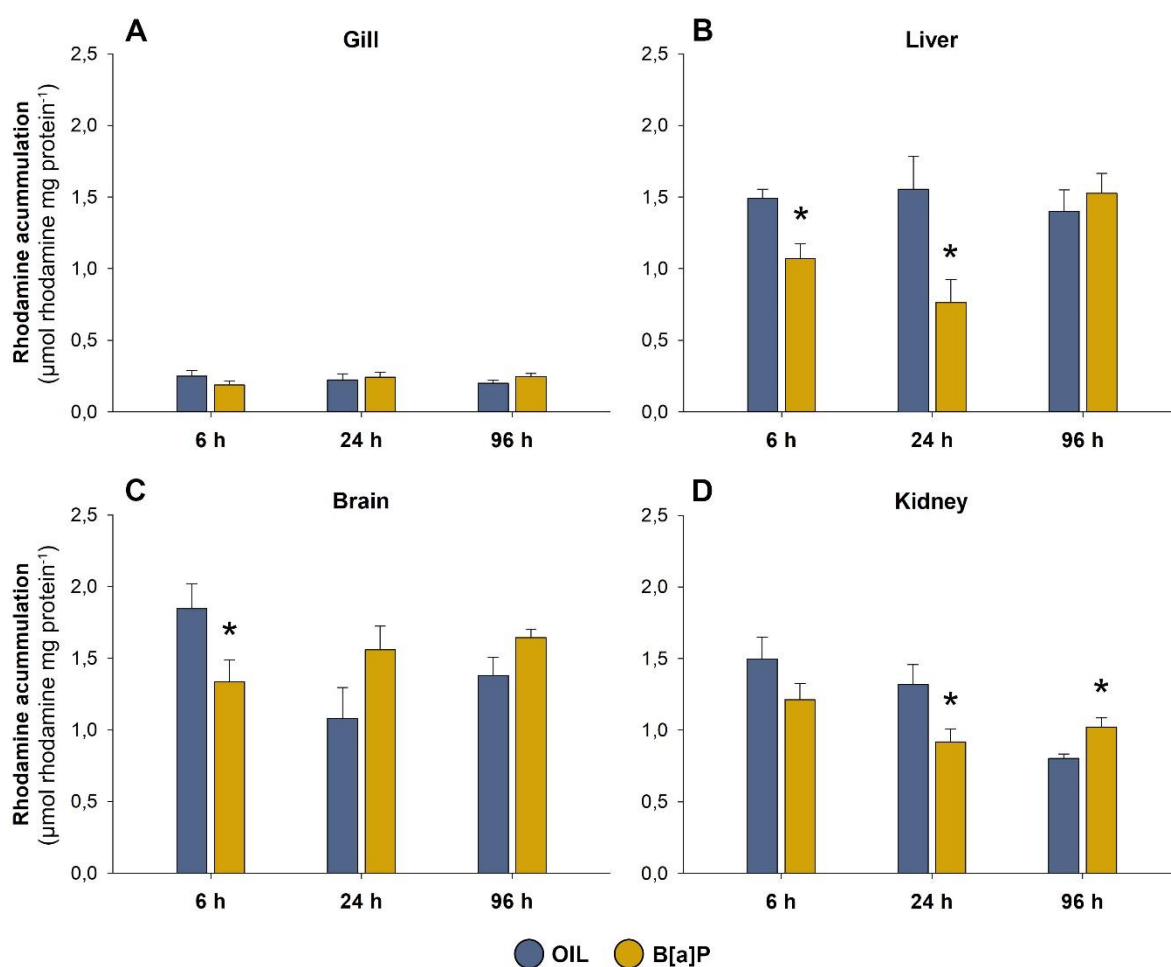


Fig 3.1. Acúmulo de rodamina (média \pm SE, n = 5-9) nas brânquia (A), fígado (B), cérebro (C) e rim (D) de *P. lineatus* após 6, 24 e 96 h da injeção intraperitoneal de B[a]P (20 mg kg⁻¹) ou apenas do veículo (OIL). * Indica uma diferença significativa entre o grupo B[a]P e o respectivo grupo OIL do mesmo tempo experimental (p \leq 0,05).

houve variação significativa no escore de danos, mas as células renais do grupo B[a]P apresentaram diminuição na frequência de danos de classe 3 ($U = 30,000$, $p = 0,035$) (Fig. 3.3 D). As células renais apresentaram aumento no escore de dano em 6 h ($U = 24.000$, $p = 0,053$) e 96 h ($t = -3,459$, $p = 0,003$) (Fig. 3.2 D).

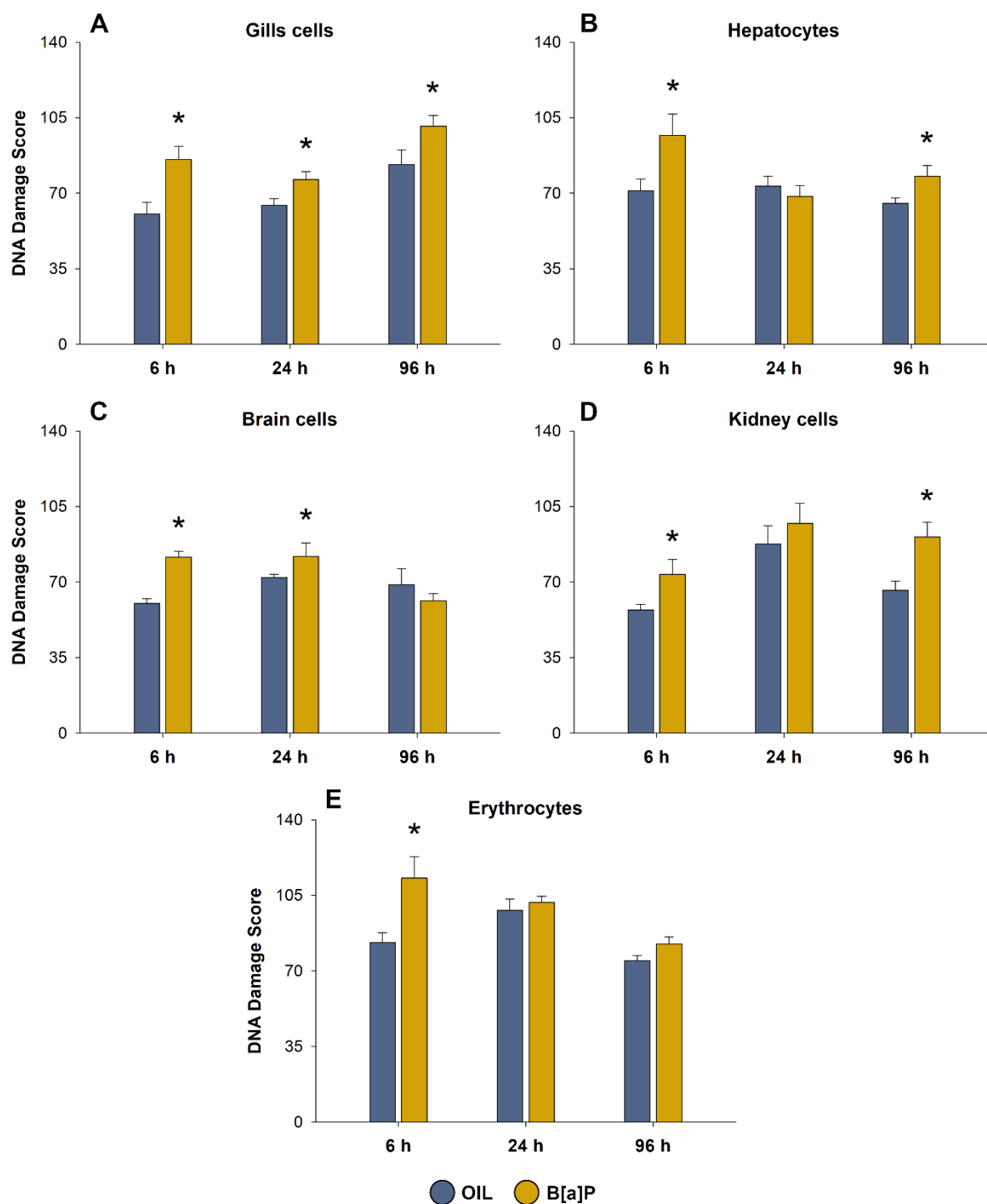


Fig 3.2. Escore de danos no DNA (média \pm SE, $n = 9-10$) nas células branquiais (A), hepatócitos (B), células cerebrais (C), células renais (D) e eritrócitos (E) de *P. lineatus* após 6, 24 e 96 h da injeção intraperitoneal de B[a]P (20 mg kg^{-1}) ou apenas do veículo (OIL). * Indica uma diferença significativa entre o grupo B[a]P e o respectivo grupo OIL do mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$).

Os eritrócitos mostraram um aumento significativo no escore de danos no DNA apenas em 6 h ($t = -2,633$, $p = 0,017$) (Fig. 3.2 E), mas a frequência de danos de classe 2 foi maior em 6 h ($t = -2,806$, $p = 0,012$) e 96 h ($U = 5.000$, $p = 0,001$), em conjunto com uma frequência menor da classe 1 nos mesmos tempos experimentais

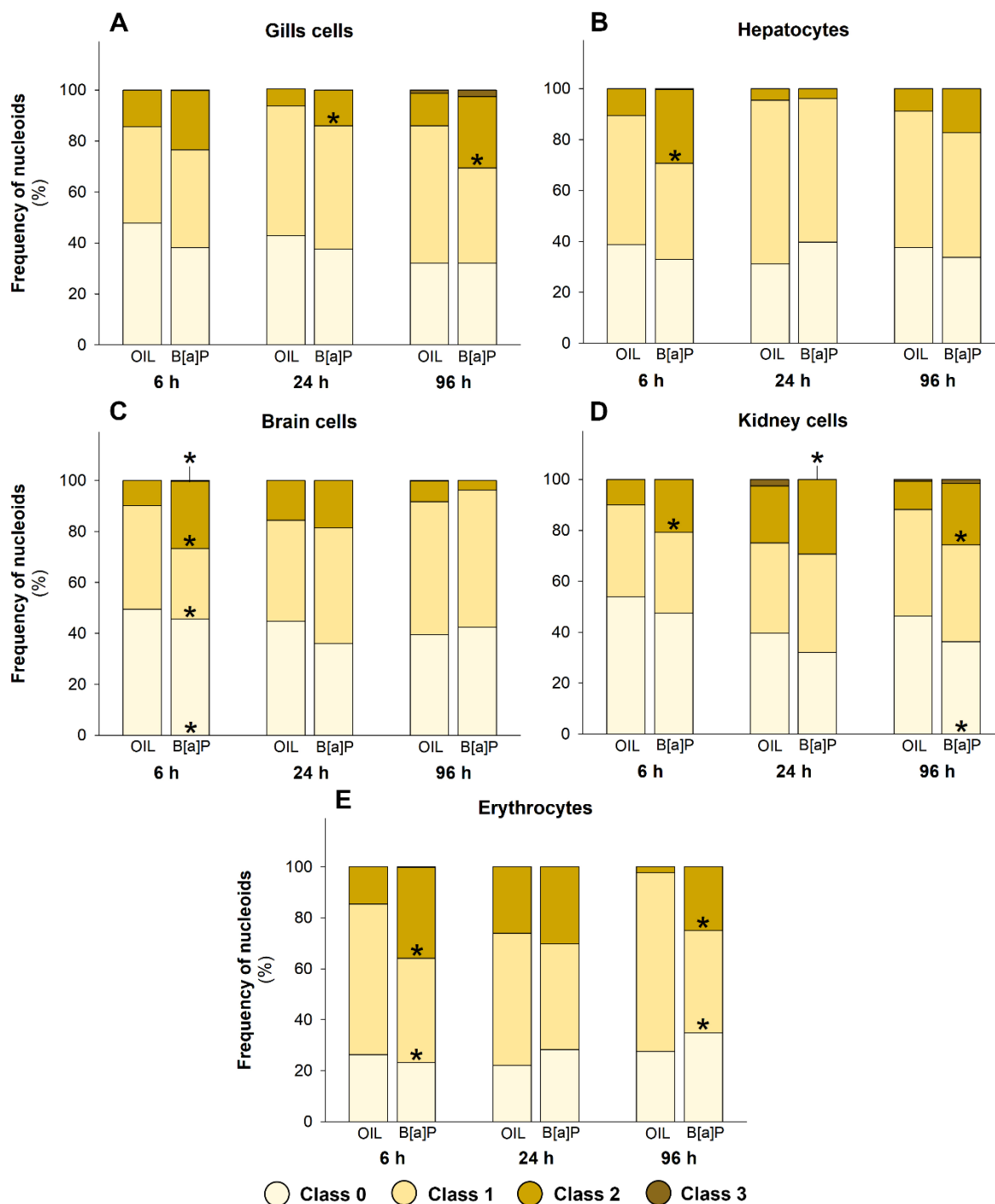


Figura 3.3. Frequência de nucleoides em cada classe de dano (média \pm SE, $n = 9-10$) nas células branquiais (A), hepatócitos (B), células cerebrais (C), células renais (D) e eritrócitos (E) de *P. lineatus* após 6, 24 e 96 h da injeção intraperitoneal de B[a]P (20 mg kg⁻¹) ou apenas do veículo (OIL). * Indica uma diferença significativa entre o grupo B[a]P e o respectivo grupo OIL do mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$).

($t = 3,261$, $p = 0,004$; $U = 11,500$, $p = 0,004$, respectivamente) (Fig. 3.3 E).

Além disso, usando o coeficiente de correlação de Spearman, o escore de danos das células cerebrais e dos eritrócitos apresentaram uma correlação significativa moderada com o tempo experimental, com $\rho = -0,575$ ($p < 0,001$) e $\rho = -0,559$ ($p < 0,001$), respectivamente. Nenhum outro órgão apresentou correlação significativa com o tempo.

4 Discussão

O mecanismo MXR apresenta um papel chave na biotransformação de xenobióticos por meio do efluxo desses compostos e seus metabólitos para fora das células, o que favorece a sua excreção e evita o seu acúmulo no interior celular (Lončar et al., 2010). De maneira geral, as evidências apresentadas no presente trabalho dão suporte a hipótese de que existe uma modulação órgão-específica no mecanismo MXR do peixe *P. lineatus*. As respostas distintas de cada órgão frente à presença de um xenobiótico dependem da distribuição das proteínas ABC entre os tecidos (Lončar et al., 2010), da capacidade de biotransformação de cada órgão (Leggieri et al., 2019) e das características ecológicas da espécie estudada (Macêdo et al., 2019). Além disso, a indução de danos no DNA encontrada neste trabalho e o possível reparo ao longo do tempo também apresentam uma variação órgão-específica. Neste contexto, as diferenças no tipo celular e no metabolismo de cada órgão podem ser espécie e tecido-específico, variando também dependendo da via de exposição aos compostos químicos e do estágio de desenvolvimento do animal (Ali et al., 2009; Kienzler et al., 2013; Mohanty et al., 2011).

O fígado apresentou um aumento na MXR em dois tempos experimentais: 6 h e 24 h. O fígado é um dos principais órgãos biotransformadores quando considerada a concentração de enzimas envolvidas neste processo, o que determina sua função no metabolismo de compostos endógenos e exógenos através das fases I e II de biotransformação (Schlenk et al., 2008; Tierney et al., 2013). Em complemento, a expressão dos transportadores ABC é elevada em órgãos envolvidos no metabolismo e excreção, como o fígado e o rim (Luckenbach et al., 2014), o que caracteriza a relevância do fígado no coordenado mecanismo de defesa que protege o organismo dos possíveis danos causados pelos xenobióticos (Ferreira et al., 2014). A associação do papel fisiológico do órgão com a distribuição dos transportadores ABC foi demonstrado por Lončar et al. (2010), onde

transportadores ABC responsáveis pelo efluxo de sais biliares altamente tóxicos dos hepatócitos para os canalículos biliares são principalmente expressos no fígado de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Por outro lado, a atividade hepática da MXR no estudo de Assef et al. (2019) em 4 espécies de peixes de água doce da Patagônia demonstrou elevada atividade basal e alta capacidade de indução em locais contaminados, porém o papel de destaque do fígado na MXR não foi comum para todas as espécies estudadas, ressaltando a importância de ampliar o conhecimento em outras espécies de peixes e outros órgãos do organismo.

A atividade da MXR no fígado apresentou uma cinética distinta dos outros órgãos, iniciando com um aumento da atividade em 6 h, atingindo a maior atividade em 24 h e retornando aos valores basais em 96 h. Após 24 h da ativação da MXR não foi observado aumento no escore de danos no DNA nos hepatócitos. É importante considerar que os danos no DNA medidos através do ensaio do cometa são o resultado tanto da pressão genotóxica como da atividade de reparo do DNA. Dependendo do tipo celular, após a ação de um agente genotóxico pode ser observada a diminuição dos danos ao longo do tempo devido à atuação do mecanismo de reparo (Raphael et al., 2014). Assim, a ocorrência de danos no DNA em 6 h após uma única injeção de B[a]P pode estar relacionada com a formação de metabólitos reativos BPDEs durante a fase I de biotransformação. Após 24 h, com a atuação continuada da MXR, o B[a]P e seus metabólitos podem ter sido transportados dos hepatócitos para os canalículos biliares e para a corrente sanguínea, reduzindo a disponibilidade de compostos reativos no interior celular e favorecendo o reparo do DNA. Em complemento, em 96 h, a MXR retorna aos valores basais e os danos no DNA voltam a aumentar, provavelmente devido a presença de algum metabólito remanesce ou proveniente da corrente sanguínea, o que ressalta a atuação da MXR para diminuir a pressão genotóxica. Uma análise da expressão gênica no fígado do peixe *Gobiocypris rarus* demonstrou que a exposição ao B[a]P pode desencadear a parada do ciclo celular, estimular o reparo do DNA e ativar vias de apoptose nos hepatócitos (Yuan et al., 2017). Assim, a dinâmica entre ocorrência de danos no DNA nos hepatócitos decorre da função fisiológica desempenhada pelo fígado, pois a pressão genotóxica causada pela ativação ou detoxificação dos poluentes é acompanhada da capacidade de reparo de danos, que são determinantes para a manutenção celular.

Após a injeção intraperitoneal de B[a]P, o aumento na MXR ocorreu rapidamente no fígado e no cérebro de *P. lineatus*, mas diferentes mecanismos fisiológicos resultam nessa indução nos diferentes órgãos. Enquanto o fígado tem papel relevante como órgão biotransformador, a rápida resposta da MXR no cérebro indica a importância desse mecanismo na proteção do cérebro contra o acúmulo de xenobióticos e seus metabólitos. Para garantir o funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC), a composição química dos seus fluidos extracelulares está sob rigoroso controle fisiológico e o movimento de moléculas entre o sangue e o SNC está restrito à interfaces anatômicas, tais como a barreira hematoencefálica (Brown et al., 2018; Luckenbach et al., 2014). Os transportadores ABC são importantes componentes na permeabilidade de barreiras como a hematoencefálica, e a expressão de transportadores ABC pode ser comparativamente maior no cérebro do que em outros órgãos (Lončar et al., 2010). Assim, o aumento na atividade da MXR em 6 h no cérebro deve-se à atividade dos transportadores ABC em resposta a presença de B[a]P, demonstrando a alta regulação do trânsito de solutos no cérebro.

Entretanto, a ocorrência de danos no DNA em 6 e 24 h no cérebro sugere a entrada de B[a]P através da barreira hematoencefálica, embora nenhuma alteração significativa no escore de danos tenha sido observada em 96 h. A frequência de nucleoides mostrou um aumento na frequência dos danos 2 e 3 em 6 h, mas em 24 h não foi possível observar a mesma ocorrência, apesar do escore de danos permanecer significativamente elevado. Além disso, a correlação encontrada entre o escore de dano e o tempo experimental enfatiza a diminuição dos danos no DNA no cérebro ao longo do tempo. O cérebro mostrou-se um órgão com habilidade de biotransformação induzida em *P. lineatus*, mas a função protetora da barreira hematoencefálica modula a cinética de resposta do órgão quando um xenobiótico a atravessa (Santos; Martinez, 2020). Os mecanismos de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e o reparo por excisão de bases (BER) são responsáveis pelo reparo de lesões causadas por HPAs (Chatterjee e Walker, 2017). Já foi demonstrado que o cérebro de três espécies de peixes do gênero *Xiphophorus* possuem de duas a três vezes mais atividade de BER do que o fígado e as brânquias (Walter et al., 2001). Associando a resposta da MXR e o escore de danos no DNA ao longo do tempo, sugere-se que a entrada do B[a]P através da barreira hematoencefálica gerou uma maior atividade do mecanismo MXR, mas não foi possível evitar a ocorrência de danos na molécula de DNA após ativação das

enzimas de biotransformação do órgão. Porém, com o efluxo do B[a]P pelas proteínas ABC ocorreu o restabelecimento do escore de danos em níveis basais em 96 h. Apesar da conhecida atividade de reparo do DNA no cérebro, a permanência dos danos foi mais prolongada nesse órgão, possivelmente devido a indução mais lenta do mecanismo de biotransformação (Santos; Martinez, 2020). Até o momento, poucos dados na literatura mensuram a MXR no cérebro de peixes expostos à poluentes, porém existem caracterizações relevantes sobre os padrões tecido-específicos na expressão de genes de transportadores ABC como as descritas para *Chelon labrosus* (Diaz de Cerio et al., 2012), *Jenynsia multidentate* (Amé et al., 2009) e *Cyprinus carpio* (Liu et al., 2016).

Nossos resultados mostram que o rim apresentou um aumento significativo na MXR em 24 h, uma resposta mais lenta do que no fígado e no cérebro. Porém, em 96 h, o rim foi o único órgão testado de *P. lineatus* que apresentou um acúmulo significativo de rodamina, o que representa uma menor atividade da MXR. De maneira geral, o rim posterior dos peixes é o principal órgão para eliminação de água e particularmente determinante na reabsorção de íons em peixes de água doce. Além disso, o rim dos peixes apresenta grande importância na excreção de xenobióticos devido ao seu grande aporte sanguíneo, que através da filtração glomerular e secreção ativa tubular excreta na urina os resíduos metabólicos e compostos químicos endógenos e exógenos (Luckenbach et al., 2014; Pritchard et al., 1984). Entretanto, a excreção renal depende das propriedades químicas do xenobiótico, pois moléculas mais hidrofílicas, como os metabólitos intermediários do processo de biotransformação, possuem maior afinidade com o mecanismo de excreção renal e tem menor probabilidade de serem reabsorvidas (Pritchard et al., 1984). Apesar do rim dos peixes apresentar uma elevada capacidade de indução do processo de biotransformação (Santos; Martinez, 2020; Ortiz-Delgado et al., 2008; Rees et al., 2003) e da conhecida presença dos transportadores ABC neste órgão (Liu et al., 2016; Lončar et al., 2010; Tutundjian et al., 2002), a caracterização da MXR continua incerta. Portanto, sugerimos que a MXR no rim auxilia na excreção de HPAs, porém a ativação dessa via é mais lenta em *P. lineatus*, além de demandar a presença de metabólitos intermediários no plasma que são gerados ao longo do tempo nas próprias células renais e nos outros órgãos do animal pelo mecanismo de biotransformação (Santos; Martinez, 2020). Já a diminuição da atividade da MXR em 96 h no rim de *P. lineatus* pode estar

relacionada com a saturação das proteínas com metabólitos a serem transportados. Isso porque a maior taxa de excreção de HPAs ocorre através do efluxo dos metabólitos após a biotransformação para o interior da vesícula biliar e posterior excreção pelo trato gastrointestinal através da bile (Koglin et al., 2016; Pampanin et al., 2016). Entretanto, como a bile é uma secreção digestiva, a eliminação de compostos por essa via está diretamente ligada ao estado alimentar do organismo (Aas et al., 2000), e portanto, como os animais não foram alimentados durante o experimento, a eliminação de B[a]P através da bile pode ter sido diminuída. Dessa forma, a eliminação através da urina por um tempo prolongado provocou uma sobrecarga nos transportadores ABC do rim após 96 h e o consequente acúmulo de rodamina. Como os metabólitos intermediários do B[a]P são altamente reativos, a presença desses metabólitos nas células renais podem ter provocado o aumento na frequência de danos no DNA classe 2 em 6 h e o aumento no escore de danos no DNA em 96 h. Além disso, é importante ressaltar que durante a saturação na atividade da MXR em 96 h, o escore de danos no DNA aumentou significativamente, enquanto no tempo de maior indução na MXR, os danos no DNA não foram observados, sugerindo a participação da MXR na diminuição da pressão genotóxica.

Apesar da conhecida importância das brânquias na biotransformação de xenobióticos presentes na água e também como uma via secundária importante para compostos ingeridos (Costa et al., 2011; Rees et al., 2003), relativamente pouco se sabe sobre a presença de transportadores ABC neste tecido. Em geral, os transportadores ABC exibem uma expressão baixa nesse órgão, sugerindo que as brânquias podem não ser essenciais para a excreção de xenobióticos (Costa et al., 2012; Lončar et al., 2010). Nesse sentido, relatamos ausência de alterações na atividade do mecanismo MXR nas brânquias de *P. lineatus* após indução através da injeção intraperitoneal de B[a]P. Porém, já foi observada a atividade moderada da MXR no tecido branquial de *Hatcheria macraei*, *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss* e *Oncorhynchus tshawytscha* (Assef et al., 2019), assim como a MXR branquial de 26 espécies de peixes estuarinos pode afetar a distribuição e abundância das espécies em ambientes impactados (Macêdo et al., 2019). Desta forma, a atividade da MXR nas brânquias possui padrões espécie-específicos que necessitam de melhor elucidação. Apesar da ausência de alteração significativa da MXR nas brânquias no presente trabalho, as células branquiais foram as únicas a apresentarem um aumento significativo no escore de danos no DNA em todos os

tempos experimentais. O aumento no escore de danos no DNA corrobora estudos anteriores com o peixe *P. lineatus*, os quais já demonstraram que as brânquias desta espécie desempenham uma função determinante na biotransformação de xenobióticos circulantes, porém a ativação desse mecanismo é mais lenta (Santos; Martinez, 2020; Santos et al., 2018), e até mesmo o sistema de reparo em células branquiais pode ser mais lento (Cavalcante et al., 2008; Santos et al., 2018), e portanto, as células danificadas podem permanecer por mais tempo no tecido.

A atuação dos transportadores ABC responsáveis pela MXR transfere o xenobiótico e seus metabólitos para a vesícula biliar e para a corrente sanguínea. Uma vez no sangue, os compostos podem se associar principalmente à proteínas plasmáticas, e também ao colesterol, triglicerídeos e membranas celulares (Tierney et al., 2013). Desta forma, os HPAs podem causar alterações hematológicas, além de serem transportados para outros tecidos do peixe. Entretanto, nossos resultados indicam a ausência de alterações nos parâmetros hematológicos do peixe *P. lineatus* nos três tempos experimentais após a única injeção intraperitoneal de B[a]P. Além disso, a viabilidade das células verificada antes do ensaio do cometa foi maior que 90%. Em contrapartida, foi observado um aumento no escore de danos no DNA dos eritrócitos após 6 h, assim como aumento significativo de danos de classe 2 em 6 e 96 h. Desta forma, o aumento significativo de danos no DNA nos eritrócitos após 6 h da injeção indica a biotransformação do B[a]P nos órgãos metabolizadores e a ação genotóxica dos metabólitos reativos resultantes da fase I de biotransformação. A ocorrência de danos no DNA de eritrócitos após injeção intraperitoneal de B[a]P foi demonstrada em um estudo de Sadauskas-Henrique et al. (2017), no qual o peixe tropical *Colossoma macropomum* apresentou aumento significativo no escore de danos 96 h após injeção intraperitoneal de B[a]P. No presente trabalho, apesar da elevada capacidade de biotransformação dos órgãos estudados, não foi observado aumento no escore de danos no DNA nos eritrócitos nos tempos de 24 e 96 h. Porém, em 96 h, houve um aumento na frequência de danos classe 2 e diminuição dos danos classe 1. Como o ensaio do cometa detecta danos no DNA passíveis de reparo, é possível que tenham ocorrido danos genotóxicos, mas que foram reparados nos tempos mais longos, o que pode ser justificado pela correlação entre o escore de danos e o tempo experimental.

O uso de eritrócitos em análise de danos no DNA é muito comum devido a facilidade de coleta e uso. Porém, comparativamente, as células branquiais e do

fígado podem ser mais sensíveis aos danos do que as células sanguíneas (Ali et al., 2009; Mohanty et al., 2011). De maneira geral, a própria circulação sanguínea é pela resposta integrada dos mecanismos de biotransformação nos diferentes órgãos estudados, redistribuindo o xenobiótico e seus metabólitos. Inclusive, o aumento significativo na frequência de danos de classe 2 em 96 h nos eritrócitos, assim como o aumento significativo no escore de danos no fígado, podem estar relacionados com a diminuição da MXR no rim no mesmo tempo experimental, pois o B[a]P e seus metabólitos que não foram excretados podem ter permanecido no sangue e causado uma pressão genotóxica nos eritrócitos e hepatócitos.

Conclusão

A indução do mecanismo MXR em *P. lineatus* apresenta características órgão-específicas influenciadas pelas funções fisiológicas exercidas por cada órgão e as respectivas habilidades de biotransformação. A habilidade de indução da MXR está intimamente ligada à integridade do DNA na presença de B[a]P, uma vez sua indução atuou para evitar o acúmulo do xenobiótico no interior celular, diminuindo a ocorrência de danos no DNA. O fígado apresentou uma rápida e prolongada indução da MXR após a injeção de B[a]P, o que caracteriza sua função metabolizadora e justifica a presença de B[a]P encontrado na bile em trabalhos anteriores. Da mesma forma o cérebro apresentou uma rápida indução na MXR, na tentativa de proteger o órgão do xenobiótico. O rim apresentou uma resposta mais lenta na indução da MXR, que pode estar relacionada com a maior afinidade do órgão pela excreção de metabólitos de HPAs produzidos na biotransformação. Além disso, a diminuição da MXR observada no rim em 96 h indica uma sobrecarga no mecanismo de excreção de metabólitos de HPA advindos de todos os demais órgãos metabolizadores. Apesar da elevada capacidade de indução do mecanismo de biotransformação, as brânquias não parecem desempenhar uma via importante de efluxo de xenobióticos por transportadores ABC em *P. lineatus*. A indução da MXR e a frequência de danos no DNA nos diferentes órgãos de *P. lineatus* forneceram informações relevantes sobre a atuação coordenada dos mecanismos de biotransformação e circulação do xenobiótico pelo organismo. No futuro, estudos que caracterizem a expressão de transportadores ABC e proteínas reparo do DNA em *P. lineatus*, podem adicionar informações importantes na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na detoxificação integrada do peixe Neotropical *P. lineatus*.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Este trabalho faz parte da tese de doutorado de C. Santos, que recebeu uma bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). C. B. R. Martinez é pesquisador bolsista do Conselho Brasileiro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 307947/2015-7).

Referências

- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O.K., 2000. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquat. Toxicol.* 51, 241–258. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00108-9)
- Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W.S., 2009. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food Chem. Toxicol.* 47, 650–656. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.12.021>
- Alvim, T.T., Martinez, C.B.R., 2019. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 842, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.11.011>
- Amé, M.V., Baroni, M.V., Galanti, L.N., Bocco, J.L., Wunderlin, D.A., 2009. Effects of microcystin–LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74, 1179–1186. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.068>
- Assef, Y.A., Di Prinzio, C.Y., Horak, C.N., 2019. Differential activities of the multixenobiotic resistance mechanism in freshwater fishes inhabiting environments of Patagonia Argentina. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 19, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.11.019>
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389. <https://doi.org/10.1016/S0166->

445X(00)00088-6

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brown, N.M.O., Pfau, S.J., Gu, C., 2018. Bridging barriers: A comparative look at the blood – brain barrier across organisms. *Genes Dev.* 32, 466–478. <https://doi.org/10.1101/gad.309823.117.ripherally>
- Budinsky, R.A., Schrenk, D., Simon, T., Van Den Berg, M., Reichard, J.F., Silkworth, J.B., Aylward, L.L., Brix, A., Gasiewicz, T., Kaminski, N., Perdew, G., Starr, T.B., Walker, N.J., Rowlands, J.C., 2014. Mode of action and dose-response framework analysis for receptor-mediated toxicity: The aryl hydrocarbon receptor as a case study. *Crit. Rev. Toxicol.* 44, 83–119. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.835787>
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 655, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.06.010>
- Chatterjee, N., Walker, G.C., 2017. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* 58, 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Chiaro, C.R., Patel, R.D., Marcus, C.B., Perdew, G.H., 2007. Evidence for an aryl hydrocarbon receptor-Mediated cytochrome P450 autoregulatory pathway. *Mol. Pharmacol.* 72, 1369–1379. <https://doi.org/10.1124/mol.107.038968>
- Costa, J., Ferreira, M., Rey-Salgueiro, L., Reis-Henriques, M.A., 2011. Comparison of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo(a)pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere* 84, 1452–1460. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.046>
- Costa, J., Reis-Henriques, M.A., Castro, L.F.C., Ferreira, M., 2012. Gene expression analysis of ABC efflux transporters, CYP1A and GST α in Nile tilapia after exposure to benzo(a)pyrene. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 155, 469–482. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.004>
- Diaz de Cerio, O., Bilbao, E., Cajaraville, M.P., Cancio, I., 2012. Regulation of xenobiotic transporter genes in liver and brain of juvenile thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) after exposure to Prestige-like fuel oil and to perfluorooctane

- sulfonate. *Gene* 498, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.067>
- Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C.N., Macmanus-Spencer, L.A., Haumdoun, A., Smital, T., 2008. Efflux transporters: Newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3914–3920. <https://doi.org/10.1021/es087187v>
- Ewa, B., Danuta, M.Š., 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J. Appl. Genet.* 58, 321–330. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>
- Ferreira, M., Costa, J., Reis-Henriques, M.A., 2014. ABC transporters in fish species: A review. *Front. Physiol.* 5, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00266>
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2012. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 743, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.10.017>
- Häder, D.P., Banaszak, A.T., Villafañe, V.E., Narvarte, M.A., González, R.A., Helbling, E.W., 2020. Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. *Sci. Total Environ.* 713, 136586. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136586>
- Juricek, L., Coumoul, X., 2018. The aryl hydrocarbon receptor and the nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2504. <https://doi.org/10.3390/ijms19092504>
- Kienzler, A., Bony, S., Devaux, A., 2013. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review. *Aquat. Toxicol.* 134–135, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.005>
- Koglin, S., Kammann, U., Eichbaum, K., Reininghaus, M., Eisner, B., Wiseman, S., Hecker, M., Buchinger, S., Reifferscheid, G., Hollert, H., Brinkmann, M., 2016. Toward understanding the impacts of sediment contamination on a native fish species: Transcriptional effects, EROD activity, and biliary PAH metabolites. *Environ. Sci. Eur.* 28, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0096-3>
- Kurelec, B., Smital, T., Pivèviæ, B., Eufemia, N., Epel, D., 2000. Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9, 307–327. <https://doi.org/10.1023/A:1026560922731>
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., Coumoul, X., 2018. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2018.05.001>

- Leggieri, L.R., De Anna, J.S., Cárcamo, J.G., Cerón, G.A., Darraz, L.A., Panebianco, A., Luquet, C.M., 2019. Gills CYP1A of *Oncorhynchus mykiss* as a sensitive biomarker of crude oil pollution in freshwater environments. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 67, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.01.008>
- Liebel, S., Oliveira Ribeiro, C.A., Silva, R.C., Ramsdorf, W.A., Cestari, M.M., Magalhães, V.F., Garcia, J.R.E., Esquivel, B.M., Filipak Neto, F., 2011. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. *Toxicol. Vitro.* 25, 1493–1500. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.010>
- Liu, X., Li, S., Peng, W., Feng, S., Feng, J., 2016. Genome-wide identification, characterization and phylogenetic analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporter genes in common carp (*Cyprinus carpio*). *PLoS One* 11, e0153246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153246>
- Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M., Naidu, R., 2018. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environ. Technol. Innov.* 10, 175–193. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.001>
- Lončar, J., Popović, M., Zaja, R., Smital, T., 2010. Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 151, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.10.009>
- Luckenbach, T., Fischer, S., Sturm, A., 2014. Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 165, 28–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.05.002>
- Lushchak, V.I., 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: A mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 711–747. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5>
- Macêdo, A.K.S., da Silva, J.R.P., dos Santos, H.B., Thomé, R.G., Vendel, A.L., Amado, E.M., 2019. Estuarine fish assemblages present a species-specific difference in the multixenobiotics resistance activity. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Integr. Physiol.* 331, 530–539. <https://doi.org/10.1002/jez.2320>
- Mohanty, G., Mohanty, J., Nayak, A.K., Mohanty, S., Dutta, S.K., 2011. Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide.

- Ecotoxicology 20, 283–292. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0580-2>
- Mushtaq, N., Singh, D.V., Bhat, R.A., Dervash, M.A., Hameed, O., 2020. Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation. Fresh Water Pollut. Dyn. Remediat. 27–50. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8277-2>
- Ortiz-Delgado, J.B., Behrens, A., Segner, H., Sarasquete, C., 2008. Tissue-specific induction of EROD activity and CYP1A protein in *Sparus aurata* exposed to B(a)P and TCDD. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.12.021>
- Pampanin, D.M., Le Goff, J., Skogland, K., Marcucci, C.R., Øysæd, K.B., Lorentzen, M., Jørgensen, K.B., Sydnes, M.O., 2016. Biological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their first metabolic products in in vivo exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*). J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues 79, 633–646. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1171993>
- Pritchard, J.B., Bend, J.R., Augustine, S., 1984. Mechanisms controlling the renal excretion of xenobiotics in fish: effects of chemical structure*. Drug Metab. Rev. 15, 655–671. <https://doi.org/doi.org/10.1289/ehp.90-1519482>
- Raphael, S., Mélissa, P.L., Aurélien, B., Emmanuelle, V., Jean Marc, P., Sylvie, B., Alain, D., Wilfried, S., 2014. Kinetic response of a genotoxicity biomarker in the three-spined stickleback and implication for environmental monitoring. Ecotoxicol. Environ. Saf. 102, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.006>
- Rees, C.B., McCormick, S.D., Vanden Heuvel, J.P., Li, W., 2003. Quantitative PCR analysis of CYP1A induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquat. Toxicol. 62, 67–78. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00062-0)
- Sadauskas-Henrique, H., Duarte, R.M., Gagnon, M.M., Almeida-Val, V.M.F., 2017. Validation of a suite of biomarkers of fish health in the tropical bioindicator species, tambaqui (*Colossoma macropomum*). Ecol. Indic. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.10.010>
- Santos, C., de Oliveira, M.T., Cólus, I.M. de S., Sofia, S.H., Martinez, C.B. dos R., 2018. Expression of *cyp1a* induced by benzo(a)pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 61, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.05.008>
- Santos, C., Martinez, C.B.R., 2020. Biotransformation mechanism in the fish

- Prochilodus lineatus*: an organ-specific approach to *cyp1a* gene expression and biochemical activity. In: *Metabolismo tecido-específico de benzo[a]pireno no peixe Prochilodus lineatus: uma abordagem temporal*. Tese (Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, p.44-70.
- Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E.P., George, S., James, M., Kullman, S.W., Van Den Hurk, P., Willett, K., 2008. Biotransformation in fishes. *Toxicol. Fishes* 153–234. <https://doi.org/10.1201/9780203647295>
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Tierney, K.B., Kennedy, C.J., Gobas, F., Gledhill, M., Sekela, M., 2013. Organic contaminants and fish, *Fish Physiology*. In: Tierney, K. B.; Farrell, A. P.; Brauner, C. J. (Eds.). *Fish Physiology*. Academic Press, pp. 1-52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398254-4.00001-7>
- Tutundjian, R., Cachot, J., Leboulenger, F., Minier, C., 2002. Genetic and immunological characterisation of a multixenobiotic resistance system in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 132, 463–471. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00058-1](https://doi.org/doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00058-1)
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Lunardelli, B., de Oliveira, L.F., da Costa Cabrera, L., Risso, W.E., Primel, E.G., Meletti, P.C., Fillmann, G., Bueno dos Reis Martinez, C., 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Sci. Total Environ.* 542, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.071>
- Walter, R.B., Sung, H.-M., Obermoeller, R.D., Mitchell, D.L., Intano, G.W., Walter, C.A., 2001. Relative base excision repair in *Xiphophorus* fish tissue extracts. *Mar. Biotechnol.* 3, S050–S060. <https://doi.org/10.1007/s10126-001-0027-0>
- Yuan, L., Lv, B., Zha, J., Wang, Z., 2017. Benzo[a]Pyrene induced p53-mediated cell cycle arrest, DNA repair, and apoptosis pathways in Chinese Rare Minnow (*Gobiocypris Rarus*). *Environ. Toxicol.* 32, 979–988. <https://doi.org/10.1002/tox>

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

O presente trabalho fornece informações relevantes sobre as características órgão-específicas envolvidas na resposta integrada da biotransformação de xenobióticos no peixe *Prochilodus lineatus* após indução por injeção de benzo[a]pireno. Em cada capítulo os resultados encontrados foram discutidos de forma individual e a integração destes permite as seguintes conclusões:

- I. A capacidade de indução dos mecanismos de biotransformação através da via de sinalização AhR está presente nas brânquias, fígado, cérebro e rim, que respondem de maneira integrada à circulação do xenobiótico e seus metabólitos através da corrente sanguínea. Apesar dos diferentes tempos de resposta de cada órgão, todos apresentaram aumento na transcrição de *cyp1a* em ao menos dois tempos experimentais;
- II. A atividade da fase I de biotransformação nas brânquias é observada após 24 h de exposição, uma resposta mais lenta do que no fígado e no rim. Porém, as brânquias desempenham um papel determinante no metabolismo de xenobióticos no organismo como um todo, uma vez que apresentam a maior amplitude de atividade da EROD. Entretanto, as brânquias não parecem desempenhar uma via importante de efluxo de xenobióticos, pois não alteraram a atividade da MXR em nenhum tempo experimental. Como consequência, o acúmulo de metabólitos reativos nas brânquias parece favorecer danos genotóxicos, que acompanhados de um mecanismo de reparo do DNA mais lento, perduram por mais tempo no órgão;
- III. A conhecida característica metabolizadora do fígado pode ser observada pelos elevados valores basais de atividade da EROD e rápida indução de resposta da enzima a partir de 6 h após a injeção do B[a]P. Porém, o fígado trabalha em conjunto com os outros órgãos, uma vez que a atividade da EROD retorna aos valores basais quando outros órgãos são recrutados na biotransformação. A presença de B[a]P na bile também reforça a importância desse órgão no metabolismo de xenobióticos, corroborando a elevada e prolongada atividade da MXR. A diminuição do conteúdo de GSH observada no fígado pode estar associada à sua atuação nas defesas antioxidantes do organismo, e como a

GSH é necessária para a atividade da GST, essa diminuição no conteúdo de GSH pode ter gerado uma diminuição na atividade da GST. Em complemento, durante a maior atividade da MXR não foram observados danos no DNA, o que indica uma alta capacidade de recuperação do fígado com a redução da concentração do agente genotóxico;

- IV. O cérebro é um órgão muito protegido contra oscilações fisiológicas e isso se reflete no seu padrão de resposta dos biomarcadores. A indução na transcrição da *cyp1a* apresentou um aumento crescente ao longo do tempo e a atividade da EROD só aumentou após 24 h, revelando que o cérebro não apresenta elevada atividade basal de biotransformação, que só é ativada quando um xenobiótico ultrapassa a barreira hematoencefálica. Em contrapartida, a atividade da MXR foi prontamente induzida, para diminuir a concentração do xenobiótico no meio intracelular. A MXR não impediu a ocorrência de danos no DNA, mas pode ter favorecido sua diminuição ao longo do tempo;
- V. O rim foi o único órgão que apresentou indução da atividade da EROD nos três tempos experimentais, provavelmente pela sua participação determinante na excreção de metabólitos presentes na corrente sanguínea. Porém, a grande quantidade desses metabólitos produzidos ao longo do tempo por todos os órgãos recrutados na biotransformação pode ter ocasionado uma sobrecarga no mecanismo e a diminuição da MXR em 96 h. Como no fígado, no momento de maior indução da MXR, não foram observados danos no DNA, sinalizando a capacidade de reparo do órgão quando a pressão genotóxica diminui;
- VI. A presença de danos no DNA dos eritrócitos em 6 h demonstra a distribuição do xenobiótico para todo o organismo através do sangue. Contudo, os eritrócitos parecem apresentar uma elevada atividade de reparo do DNA, uma vez que a ocorrência de danos diminuiu ao longo do tempo. Além disso, as pequenas oscilações nas classes de cometa, observadas em 96 h nos eritrócitos, e o aumento significativo no escore de danos no fígado podem estar relacionadas com a diminuição da MXR no rim no mesmo tempo experimental, o que reforça a atuação do sangue na integração das respostas dos demais órgãos.
- VII. No futuro, estudos que caracterizem a expressão de transportadores ABC e proteínas de reparo do DNA em *P. lineatus* devem acrescentar informações importantes na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nas vias de detoxificação do peixe Neotropical *P. lineatus*.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Juntamente com os experimentos desenvolvidos para coleta de amostras para as análises apresentadas nos capítulos anteriores, foram realizados procedimentos cabíveis para sequenciar e desenhar *primers* específicos para avaliação da expressão dos genes envolvidos nas fases II e III de biotransformação de *P. lineatus*. Primeiramente, foi realizado o alinhamento de sequências gênicas de espécies de peixe obtidas do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov) para o desenho de *primers* degenerados para os genes *gstp1*, *abcb1* e *18s*. O alinhamento e o desenho dos *primers* foi realizado no software Geneious Prime. As espécies e a referência das sequências utilizadas encontram-se na Tabela A.

Tabela A - Referência das sequências utilizadas para o alinhamento e desenho de *primers* degenerados de *gstp1* e *abcb1*.

	<i>gstp1</i>	<i>abcb1</i>
<i>Cyprinus carpio</i>	DQ497597.1	AY999964.1
<i>Astyanax mexicanus</i>	XM_007253626.1	XM_007242086.2
<i>Carassius auratus</i>	EU183358.1	DQ059072.1
<i>Danio rerio</i>	NM_131734.3	-
<i>Pygocentrus nattereri</i>	XM_017711527.1	-
<i>Gobio gobio</i>	JN166432.1	-
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	DQ501283.1	-
<i>Gobiocypris rarus</i>	-	JX017258.1

A partir dos *primers* degenerados foram realizadas PCR convencionais utilizando primeiramente cDNA e posteriormente DNA extraído de *P. lineatus*, com o objetivo de enviar os produtos de amplificação para sequenciamento e posterior desenho de novos *primers* específicos para a espécie. Porém, apesar das adaptações de protocolo e otimizações da PCR, nenhuma amplificação foi observada. Foram realizadas nos procedimentos e materiais utilizados na extração

para garantir a qualidade do material extraído, mas as amplificações não foram satisfatórias

Com a realização dos experimentos e análise dos resultados das demais técnicas empregadas, observou-se a necessidade de explorar a expressão de outros genes, como os genes envolvidos no reparo do DNA. A partir da experiência anterior no desenho de *primers* degenerados, optou-se por outra abordagem: a escolha de *primers* disponíveis na literatura para o peixe *Danio rerio*. Os *primers* e as referências utilizadas estão descritas na Tabela B.

Tabela B – *Primers* utilizados nas reações de PCR para obtenção de produtos amplificados de *P. lineatus*.

	<i>primers</i>	Produto amplificado	Referência
<i>gstp1</i>	F: 5' TCTACCAGGAATAYGAVACYG 3' R: 5' TTGATGGGMAGTTTCTTRWAG 3'	245 pb	-
<i>abcb1</i>	F: 5' GVAAGAGYACCACCRGCC 3' R: 5' CARTGKATGTTTCAGHTGC 3'	165 pb	-
<i>abcb4</i>	F: 5' TACTGATGATGCTTGGCTTAATC 3' R: 5' TCTCTGGAAAGGTGAAGTTAGG 3'	159 pb	Verbueken et al, (2018)
<i>ogg1</i>	F: 5' ACAGAAAGGAAAAGTGAAGA 3' R: 5' TGAGAAAAGACTCCACAGGA 3'	274 pb	Ling et al, (2017)
<i>xpc</i>	F: 5' TATGGAGACCAAAAAGAACCTCA 3' R: 5' CAGGTTTCGACTCAAGTGCTAGT 3'	305 pb	Sandrini et al, (2009)
18S	F: 5' GTAGTCATATGCTTGTCTC 3' R: 5' TCCGCAGGTTACCTACGGA 3'	377 pb	Penitente et al, (2015)

As amplificações com amostras de *P. lineatus* realizadas com *primers* de *Danio rerio* apresentaram algumas inconstâncias nos resultados, porém foi possível visualizar uma banda fraca mais frequente para o gene *abcb4*. As quatro amostras que apresentaram alguma amplificação com o *primer* de *abcb4* foram enviadas para sequenciamento. Porém, a sequência obtida apresentava baixa qualidade. Desta forma, não foi possível estabelecer novas sequências de genes envolvidos na biotransformação e reparo do DNA para o peixe *P. lineatus*.

Em contato com o professor doutor Afonso Bainy da Universidade Federal

de Santa Catarina, que trabalhou na montagem *de novo* do transcriptoma de *P. lineatus*, foi possível acessar algumas sequências anotadas, porém nenhuma de interesse imediato para o presente trabalho. Contudo, de forma geral, faz-se necessário o estabelecimento de técnicas moleculares na análise ecotoxicológica com espécies nativas, uma vez que podem contribuir para a compreensão do mecanismo de ação do contaminante e elucidar as adaptações espécie-específicas.

Além disso, foi realizado um estágio no exterior através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (Processo: 88881.190553/2018-01) no laboratório do prof. dr Mathilakath Vijayan situado na University of Calgary (Canadá). Durante o período de setembro de 2018 a março de 2019 foi realizado o projeto “Efeitos de produtos farmacêuticos no desenvolvimento de peixes”. O foco do projeto foi entender o impacto da carbamazepina, uma droga anticonvulsivante detectada em ambientes aquáticos, no desenvolvimento, comportamento, resposta ao estresse e reprodução de *zebrafish* (*Danio rerio*). O objetivo do estudo foi determinar se a carbamazepina tem efeitos a longo prazo na resposta de estresse e na reprodução de *zebrafish*, bem como no desenvolvimento precoce e comportamentos relacionados ao estresse na progênie.

Após o treinamento de segurança obrigatório, foi iniciada a reprodução de *zebrafish* previamente expostos à carbamazepina em diferentes concentrações. Foi monitorado o sucesso reprodutivo desses peixes, avaliando sua fecundidade, bem como o desempenho embrionário, incluindo desenvolvimento, comportamento e resposta ao estresse na geração F1. Após a conclusão da reprodução, foi realizado um teste de estresse com os adultos reprodutores para examinar o quanto bem eles respondem aos estressores. Todos os métodos aprendidos durante o doutorado sanduíche estão descritos abaixo:

- Cuidado e manutenção de *zebrafish* em laboratório;
- Coleta de embriões e observação de marcadores de desenvolvimento;
- Avaliação do comportamento das larvas;
- Avaliação de resposta ao estresse das larvas;
- Avaliação de resposta ao estresse dos adultos;
- Extração de RNA e execução de qPCR.

Como o projeto no laboratório continuou em andamento após a conclusão do estágio, a elaboração do artigo resultante ainda se encontrava em andamento até a conclusão desta tese.

Referências

- PENITENTE, M.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. B chromosomes in the species *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae): Morphological identity and dispersion. **Comparative Cytogenetics**, v. 9, n. 1, p. 79–87, 2015.
- SANDRINI, J. Z. *et al.* Time-course expression of DNA repair-related genes in hepatocytes of zebrafish (*Danio rerio*) after UV-B exposure. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 1, p. 220–226, 2009.
- LING, L. BIN *et al.* Oxidative stress intensity-related effects of cadmium (Cd) and paraquat (PQ) on UV-damaged-DNA binding and excision repair activities in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 167, p. 10–18, 2017.
- VERBUEKEN, E. *et al.* From mRNA expression of drug disposition genes to in vivo assessment of CYP-mediated biotransformation during zebrafish embryonic and larval development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 3976, 2018.

ANEXOS

Anexo I: Aprovação dos procedimentos com animais pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina

Anexo II: Carta de conclusão do Doutorado Sanduíche enviada à CAPES pelo prof. dr. Mathilakath Vijayan



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 74/2017

Londrina, 14 de Junho de 2017.

Prezado (a) professor (a)


Certificamos que o projeto intitulado: "**Avaliação temporal de expressão de genes de diferentes fases de Biotransformação e atividades destes mecanismos em vários órgãos do peixe prochilodus lineatus.**" protocolo CEUA nº **6625.2017.37**, sob a responsabilidade de **Cláudia Bueno dos Reis Martinez**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **30/05/2017**.

O Objetivo é caracterizar a expressão de genes e a atividade de enzimas e mecanismos envolvidos na biotransformação de xenobióticos em diferentes órgãos de *P. lineatus* e avaliar a variação temporal destes parâmetros após a contaminação por B(a)P por vias distintas.
Grau de Invasividade=2

Vigência do Projeto	30/06/2017 a 30/05/2019
Espécie/linhagem	Peixe
Nº de animais	170
Peso/Idade	10-20 g / Juvenis
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Piscicultura AquaNorte, localizada na Rodovia BR 369, Km 24, Cambará (PR).
Amostras a serem coletadas	Sangue, brânquias, fígado, cérebro, rim posterior, vesícula biliar.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,


Prof. Dra Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr (a). Claudia Bueno dos Reis Martinez

Responsável pelo projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas

Centro de Ciências Biológicas/CCB

C/C para a Chefia do Depto de Ciências Patológicas

C/C para O Biotério CCB

C/C para a Direção de Centro do CCB.



FACULTY OF SCIENCE
Dept of Biological Sciences
 Telephone: (403) 220 3094
 Email: matt.vijayan@ucalgary.ca

26 April 2019

Ministry of Education - MEC
 Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education – CAPES

Dear Members of the Coordination Committee:

Ms. Caroline Santos, PhD student, visited my laboratory from September 2018 to March 2019 to carry out a project on “Pharmaceutical Effects on Fish Development”. The focus of the project was to understand the impact of carbamazepine, an anticonvulsant drug detected in aquatic environments, on development, behavior, stress response and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). The aim of the study was to determine if carbamazepine has longterm effects on the stress response and reproduction, as well as effects on early development, stress performance and stress related behaviours of the progeny.

Prior to the start of her project, Ms. Caroline received the mandatory institutional animal care and laboratory training. Once the training was completed, she started breeding zebrafish that were previously exposed to carbamazepine at different concentrations. She monitored the reproductive outcome of these fish by assessing their fecundity, as well as embryo performances, including development, behavior and stress response in the F1 generation. After the completion of breeding, she carried out a stress test with the breeding adults to examine how well they respond to stressors. All the methods learned and applied on Ms. Caroline work while in my laboratory are briefly outlined below:

1. Regular care and maintenance of zebrafish

Caroline utilized the animal care protocol for zebrafish followed here at our University, and maintained, reared, and bred fish in my facility. The internship helped the student to full understand and follow the optimal conditions for zebrafish husbandry, and she has acquired the advance knowledge required to establish a zebrafish colony for research.

2. Embryo collection and developmental markers

Caroline obtained training in my laboratory for optimal breeding conditions, including eggs collection, embryo maintenance, and tracking the rate of embryos development using established markers. The developmental markers, including somite formation, head-trunk angle, hatching rate and success and mortality, were used to assess the effect of carbamazepine on early development in zebrafish.

3. Larval behavior endpoint

Zebrafish Larval behavior is commonly used in my laboratory to assess the toxicity of pharmaceuticals. Caroline learned this technique, and she is well versed to use the Zebibox tracking system (Viewpoint, Lyon, France), and tested whether the F1 larval activity was disrupted due to parental exposure to carbamazepine.

4. Larval Stress study

Cortisol response to a standardized acute stressor is routinely used in my laboratory to assess the stress performance of animals. Caroline learnt the methods and used it in her research. The cortisol stress response of zebrafish larvae were monitored by measuring the whole body levels of cortisol by ELISA. The stress test, along with the behavioural tests allowed Caroline to assess the effect of carbamezapine on larval stress performance, and stress-related behavior.

5. Adult stress study

Caroline also worked with adult zebrafish and sampled different tissues and extracted steroid for whole body. She also extracted RNA and measured protein concentrations in tissues. She also assessed the stress performance of breeding adults by subjecting the fish to a standardized acute stressor, oneminute air exposure, and measuring whole body cortisol levels. To measure cortisol, Caroline had to extract steroid from the tissues and measure the cortisol using an ELISA.

6. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Caroline did learn to run the qPCR while she was in my laboratory. She received training in sterile tissue processing, RNA extraction, cDNA synthesis and qPCR analysis of samples. However, due to the limited time she was unable to complete the qPCR analysis of her carbamezapine-treated fish samples. However, I will have another student complete this work for her.

Overall, Caroline had a very productive training period in my laboratory. She learnt a number of molecular, biochemical and physiological techniques that she can apply for ecotoxicological research. Caroline is hard working and we had a number of stimulating discussion related to her research. She was also very well liked by my research group and attended our laboratory meetings. The work carried out by her in my laboratory can be used in her thesis. I also anticipate publishing her research findings, along with some other work from my laboratory, in a toxicology journal in the near future. If you have any questions please do not hesitate to contact me.

Yours sincerely,



Mathilakath Vijayan, PhD
Professor and Canada Research Chair
Environmental Physiology and Toxicology