



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**Expressão de *CYP1A* induzido por β -
naftoflavona no peixe *Jenynsia multidentata*:
Resposta tempo-dependente, efeito da tricaina MS-
22 e análise de nadadeiras**

Debora Penha Pinto

Orientador: Juliano Zanette

Rio Grande
2014



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



**Expressão de *CYP1A* induzido por β beta-naftoflavona no peixe
Jenynsia multidentata: Resposta tempo-dependente, efeito da
tricaina MS-22 e análise de nadadeiras**

Aluno: Debora Penha Pinto

Orientador: Juliano Zanette

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2014

Pelo amor, incentivo, suporte e confiança.

Com todo amor, aos meus pais,
Gerson Luiz e Maria Carmen, exemplos
de honestidade, sabedoria e simplicidade,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, fé e força nas alegrias, nas vitórias e nos momentos difíceis que enfrentei até aqui.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPG-BAC) pelos ensinamentos passados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juliano Zanette, pela orientação, confiança, pela contribuição para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional, ensinando-me a desvendar a ciência como missão. Obrigada!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Antonio Sergio Jr. e Carine Corcini, e minha amiga Danusa, por todo o apoio, carinho e atenção que tiveram comigo no início do mestrado. Obrigada!

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular, pelo apoio e convivência diária. Não esquecendo os técnicos, Loraine Moras e Josencler Ferreira, por todas as dúvidas solucionadas.

Aos meus colegas do BAC, pela agradável convivência, principalmente durante o primeiro ano de mestrado. O apoio e a descontração durante as aulas e a semana de qualificação foram muito importantes.

Ao grupo Biomarcadores Ambientais (BAM) o qual conheci pessoas muito queridas e marcantes, Vanessa e Sabrina, levarei vocês sempre no coração. Também reencontrei e tive a oportunidade de conhecer melhor pessoas maravilhosas. Maurício, obrigada pelo profissionalismo que tivesse comigo, por toda a ajuda desde o início do mestrado e pela orientação dentro do laboratório, teria sido mais complicado sem tua presença. Obrigada, Cássia,

por todo apoio, profissionalismo dedicado, incentivo, risadas, clonagens intermináveis, por toda ajuda e atenção que tivesses comigo. Sem dúvidas, vocês fizeram a diferença!

A minha eterna companheira de aventuras, amiga, parceira, Cíntia Chivittz, por toda a dedicação e confiança posta em mim nesses 6 anos de amizade. Obrigada por estar sempre no meu lado, não importando a situação que a vida apresente. Sem tua presença, não teria conseguido chegar até aqui. Mais uma vez, obrigada minha anã!

Ao Roger Ferreira, que sempre esteve disposto a ajudar em todos os momentos, pelas dicas, experimentos, pela permanência insistente no laboratório até tarde, pelos momentos de descontração e pelas palavras “Calma, vai dar certo” que foram muito importantes.

As minhas amigas, sempre presentes, fisicamente ou em pensamento, Annie, Luiza, Lara, Marcele, Anissa, Nicolle e Ana Cândida, que compreenderam minha ausência, por escutarem minhas reclamações e aflições, por torcerem por mim. Vocês são pessoas maravilhosas, com quem compartilho vitórias e tropeços há praticamente 20 anos. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos e colegas de profissão, sempre presentes passando ou não pelos mesmos obstáculos, acompanhando de perto ou de longe, dispostos a conversar e a ajudar, especialmente minhas queridas Tchana, Dani, Ana Carolina, Fabiane e Roberta. Obrigada!

Ao Giovani Lima e Elisa Godinho pelo companheirismo, incentivo e apoio em todos os momentos que precisei. E também por fazer meus dias melhores. Obrigada!

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração dessa dissertação.

Por fim, a minha família, se cheguei até aqui foi por vocês. Obrigada, aos meus pais, irmão e tia, vocês são a base da minha vida, agradeço o apoio incondicional, incentivo, por acreditarem em mim e pelo exemplo de simplicidade e honestidade. Amo vocês!

RESUMO

O nível transcricional de *CYP1A* em organismos aquáticos é utilizado como biomarcador para a presença de contaminantes ambientais (por exemplo, HAPs). A indução de *CYP1A* no peixe Ciprinodontiforme, *Jenynsia multidentata*, foi avaliada utilizando β -naftoflavona (BNF) para identificar tempo de indução, o efeito do anestésico tricaina-metano-sulfonato (MS-222) e o uso de nadadeiras para análise. A exposição em água à 1 μ M BNF causou indução de *CYP1A* em brânquia e fígado em todos os tempos de exposição (1-96 h; $p < 0,05$) e comparado ao grupo controle com DMSO. Níveis de *CYP1A* são conhecidos por mostrar uma resposta rápida (2-6 dias), mas nossos resultados são, provavelmente, um dos primeiros que mostram que 1 h é tempo suficiente para causar esta resposta. A indução de *CYP1A* mais elevada foi atingida em primeiro lugar no gonopódio (4 h) e depois em brânquia e fígado (24-48 h e 24 – 96 h) indicando a presença de um padrão temporal de indução em diferentes órgãos. A utilização de um método não-letal em peixe, consiste na exposição *in vitro* de 1 μ M BNF de nadadeiras excisadas durante 4 h, que resultou em um elevado nível de indução nas nadadeiras caudal e anal (~49 vezes e ~69 vezes, respectivamente) em comparação com o controle (DMSO), os quais foram ainda mais elevadas do que a indução observada na exposição *in vivo* do peixe (~11- e ~10-vezes, respectivamente). Os resultados trazem perspectivas para o uso de testes *in vitro* em ecotoxicologia. Não houve influência da MS -222 no procedimento anestésico (imersão dos peixes em 100 mg.mL⁻¹ por 2-5 min) sobre os níveis basais de *CYP1A* ou na capacidade do *CYP1A* ser induzido por 1 μ M BNF, dando suporte ao uso de MS-222 nos peixes em experimentos semelhantes. Os resultados dão suporte para o uso de *J. multidentata* como organismo modelo para futuros estudos toxicológicos em ambientes aquáticos da América do Sul.

Palavras-chave: *CYP1A*; Peixe; *Jenynsia multidentata*; poluição; tricaina

ABSTRACT

The transcriptional level of *CYP1A* in aquatic organisms is used as a biomarker for the presence of environmental contaminants (e.g. PAHs). The *CYP1A* induction in the ciprinodontiforme fish *Jenynsia multidentata* was evaluated using β -naphthoflavone (BNF), to identify the time of induction, effect of the anesthetic tricaine methane sulfonate (MS-222) and using of fins for analysis. The waterborne exposure to 1 μ M BNF caused *CYP1A* induction in gill and liver in all exposure times (1-96 h; $p < 0.05$) comparing to DMSO control group. *CYP1A* levels are known to show a rapid response (2-6 days), but our results are probably one of the first showing that 1 h is enough time to cause this response. The higher *CYP1A* induction was first reached in the gonopodium (4 h) and later in gill and liver (24-48 h and 24-96 h) denoting that a temporal pattern of induction is present in different organs. The use of a fish non-lethal method, consisting of an *in vitro* 1 μ M BNF exposure of excised fins for 4 h, resulted in a high level of induction in tail and anal fins (~49-fold and ~69-fold, respectively), comparing to control (DMSO), that were even higher than induction observed in the *in vivo* fish exposure (~11- and ~10- fold, respectively). The results bring prospects to the use of *in vitro* tests in ecotoxicology. There was no influence of MS -222 anesthetic procedure (fish immersion in 100 mg mL⁻¹ for 2-5 min) on the *CYP1A* basal levels or in the *CYP1A* capacity to be induced by 1 μ M BNF, supporting the use of MS-222 for the fish use in similar experiments. The results give support for the use of *J. multidentata* as model organism for future toxicological studies in aquatic environments in South America.

Keywords: *CYP1A*; Fish; *Jenynsia multidentata*; PAH; tricaine

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
-------------------------------	----------

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. O ambiente aquático e os contaminantes orgânicos	11
1.2. O município de Rio Grande e a poluição aquática	12
1.3. Biomonitoramento e o uso de peixes como biomonitores	13
1.4. Biomarcadores ambientais	16
1.5. O biomarcador Citocromo P450 1A (CYP1A)	18
1.6. Anestesia e o uso de biópsia como método não-letal	20

2. OBJETIVOS GERAIS

2.1. Objetivos específicos	23
---	-----------

3. REFERÊNCIAS	24
-----------------------------	-----------

ARTIGO - Beta-Naphthoflavone-Induced Expression of *CYP1A* in the Guppy *Jenynsia multidentata*: Time-Dependent Response, Tricaine MS-222 Effect and Fin Analysis.

Abstract	34
-----------------------	-----------

1. Introduction	35
------------------------------	-----------

2. Materials and methods	37
---------------------------------------	-----------

2.1 Animal collection	37
------------------------------------	-----------

2.2. Time-dependent <i>CYP1A</i> induction to BNF	38
--	-----------

2.3 MS-222 effects in <i>J. multidentata</i> <i>CYP1A</i> responses	40
--	-----------

2.4. <i>In vitro</i> evaluation of <i>CYP1A</i> responses using fins	41
---	-----------

3. Results	42
-------------------------	-----------

3.1. Time-dependent <i>CYP1A</i> induction in response to BNF	42
--	-----------

3.2. MS-222 effects in <i>J. multidentata</i> <i>CYP1A</i> responses	43
---	-----------

3.3. <i>In vitro</i> fin CYP1A responses	43
4. Discussion	44
4.1. Time-dependent CYP1A induction in response to BNF	44
4.2. MS-222 effects in <i>J. multidentata</i> CYP1A responses	48
4.3. <i>In vitro</i> fin CYP1A responses	48
5. Conclusion	49
6. References	50

LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Desenho de Fêmea (♀) e macho (♂) de *Jenynsia multidentata* (Anablepidae). A seta indica o gonopódio (Fischer, 1999)..... 17

Figura 2. Representação esquemática da ordem sequencial de respostas à poluentes dentro de sistemas biológico (Arias et al., 2007) 18

Figura 3. Desenho esquemático do mecanismo de indução do gene *CYP1A* na presença de hidrocarboneto aromático policíclico 21

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1 *CYP1A* transcriptional fold induction in *Jenynsia multidentata* exposed to 1, 2, 4, 8, 24, 48 and 96 h of 1 μ M β -naphthoflavone (BNF) in gill, liver and gonopodium. *CYP1A* fold induction is denoted by numbers above the bars and was calculated using the mean value of all experimental time controls as a calibrator (DMSO). Results are shown as normalized data ($E^{-\Delta\Delta Ct}$). Actin was used as a housekeeping gene. Differences between bars were determined by one-way ANOVA followed by Tukey-HSD.63

Figure 2. Relative *CYP1A* mRNA expression levels, *in vivo*, in the gonopodium, dorsal fin and tail fin of *Jenynsia multidentata* exposed for 4 hours at 1 μ M β -naphthoflavone (BNF) compared to control (DMSO) in the presence or absence of tricaine anesthetic. *CYP1A* fold induction, in respect to control, is denoted by numbers above the bars. β -Actin was used as a housekeeping gene. Differences between bars were determined by one-way ANOVA followed by Tukey-HSD.64

Figure 3. Relative *CYP1A* mRNA expression levels, *in vitro*, in the gonopodium, dorsal fin and tail fin of *Jenynsia multidentata* exposed for 4 hours at 1 μ M β -naphthoflavone (BNF) compared to control (DMSO)) in the presence or absence of tricaine anesthetic. *CYP1A* fold induction, in respect to control, is denoted by numbers above the bars. β -Actin was used as a housekeeping gene. Differences between bars were determined by one-way ANOVA followed by Tukey-HSD.65

1 1. INTRODUÇÃO GERAL

2

3 1.1. O ambiente aquático e os contaminantes orgânicos

4

5 Águas de regimes naturais ou artificiais, permanentes ou temporários, doce,
6 salobra ou salgada constituem mosaicos de diferentes formas e ecossistemas
7 dinâmicos (Neiff, 1999). Tais áreas mantêm uma apreciável biodiversidade,
8 especialmente, as de água doce, que estão entre os habitats mais ameaçados do
9 mundo (Saunders et al., 2002). Esses ambientes apresentam estabilidade e
10 diversidade as quais estão condicionadas, primeiramente, pela hidrologia e pelo fluxo
11 de materiais (Neiff, 1999).

12 Os ambientes aquáticos são considerados receptores finais de contaminantes
13 liberados no meio ambiente e com isso estão susceptíveis a ação de poluentes pelo ar, os
14 quais acabam alcançando os corpos d'água através da deposição atmosférica, além do
15 escoamento pela precipitação (Thurman e Trujillo, 1999). Uma vez no ambiente, os
16 contaminantes podem sofrer uma combinação de processos que podem afetar o seu
17 destino e até mesmo suas propriedades dentro do ecossistema. Algumas substâncias
18 potencialmente tóxicas, e/ou os metabólitos provenientes de sua biotransformação,
19 podem persistir no ambiente por longos períodos (Costa et al., 2008).

20 Em ambientes aquáticos, os contaminantes podem passar por processos de
21 assimilação e transformação, e de transporte e transferência. Nestes dois últimos
22 processos, é possível determinar a distribuição temporal de um contaminante a partir de
23 medições de parâmetros ambientais da água (Costa et al., 2008). Além disso, processos
24 como volatilização e deposição úmida, sorção (adsorção e dessorção), precipitação e
25 sedimentação são comuns em meios aquáticos (Shaw e Chadwick, 1998; Holt, 2000).
26 Essas áreas recebem contaminantes orgânicos provenientes de diferentes fontes de
27 emissão, tais como descargas de efluentes domésticos, industriais, lixiviação de
28 pesticidas em locais de agricultura (Förstner e Wittmann, 1981) e outras atividades
29 humanas (Siroka e Drastichova, 2004). Dentre esses contaminantes, estão os
30 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), que são compostos químicos
31 constituídos basicamente de carbono e hidrogênio, possuindo anéis aromáticos. Os HAPs
32 tem ganhado importância, especialmente pela potencialidade carcinogênica, teratogênica
33 e mutagênica de alguns compostos (Aas et al., 2001).

1 A introdução desses contaminantes pode ocorrer de forma natural no ecossistema
2 através de queimadas e atividades vulcânicas ou por fontes antropogênicas de liberação
3 de HAPs que incluem descargas e derramamentos de petróleo, geração de energia
4 elétrica a partir de biomassa orgânica, esgotos urbanos e industriais, incineração de lixo,
5 aquecimento de casas além da produção de carvão e asfalto (Albers, 1995).

6 Os HAPs migram mais rapidamente através das águas e apresentam toxicidade
7 crônica significativa além de penetrar facilmente na cadeia alimentar e em alguns casos
8 são degradados lentamente (Nakhla et al., 2003). Tanto a acumulação destes compostos
9 como a sua biotransformação em moléculas mais tóxicas (bioativação) pode afetar a
10 saúde do ambiente e dos organismos expostos (Grisolia, 2005; Fleming et al., 2006).

11 Em função da elevada persistência nos sedimentos, grande parte dos PAHs é
12 considerada estável. Porém, os processos naturais capazes de ressuspender os sedimentos
13 são responsáveis pela liberação e disponibilização de contaminantes para o ambiente e
14 à coluna d'água (Reible et al., 1996), colaborando, dessa forma, para o transporte desses
15 compostos à outros locais pela hidrodinâmica (Geffard et al., 2003). A existência de
16 PAHs na coluna de água pode ter efeitos muito negativos para a biota, como por exemplo
17 em ovos e larvas de peixes e crustáceos, particularmente sensíveis aos efeitos da
18 contaminação (Lyons, 1998).

19 Devido ao caráter lipofílico, os PAHs apresentam grande facilidade de atravessar
20 membranas celulares, ocasionando o acúmulo em diferentes tecidos (Eisler, 1987). Diante
21 do exposto, e em função da abundância e toxicidade à biota, determinados PAHs são
22 considerados contaminantes prioritários (USEPA, 1995).

23

24 **1.2. O município de Rio Grande e a poluição aquática**

25

26 A cidade do Rio Grande, localizada em zona estuarina da Lagoa dos Patos no
27 extremo sul do Rio Grande do Sul, é conhecida pelo seu potencial portuário e registra
28 elevados índices de hidrocarbonetos principalmente próximos a postos de combustíveis,
29 refinaria e à área portuária (Garcia et al., 2010). A ocupação urbana apresenta
30 particularidades, especialmente em função do desenvolvimento do município ocorrer
31 próxima a Lagoa dos Patos, considerada uma área de interesse ambiental para pesquisa e
32 conservação. Os hidrocarbonetos de origem antrópica presentes nesses locais estão
33 relacionados à queima de combustíveis fósseis, lançamento de produtos petrolíferos não
34 queimados e a emissão de lixo doméstico e industrial (Medeiros et al., 2005).

1 O setor secundário é predominante na economia da cidade, sendo denominado
2 pólo industrial-portuário-viário. O Porto de Rio Grande caracteriza-se por ser o maior do
3 Estado do Rio Grande do Sul e apresenta importância regional, dentro do Mercosul. No
4 Brasil, está entre os portos com maior movimentação de cargas (Garcia et al., 2010).

5 Assim como na maioria das cidades da América Latina, o esgoto não é tratado
6 adequadamente na cidade e acaba sendo depositado em estuários, rios e oceano.
7 Ademais, em Rio Grande há uma refinaria de petróleo na região do estuário e muitas
8 indústrias de fertilizantes, que contribuem para o escoamento desses contaminantes
9 (Medeiros et al., 2005). A poluição orgânica das águas vem sendo estudada (Kantin,
10 1980; Almeida et al., 1984) e os altos níveis de PAHs totais têm sido evidenciados no
11 entorno onde há a liberação dos efluentes da refinaria presente no município, da
12 distribuidora de combustíveis e na área portuária, mais precisamente no denominado
13 Porto Novo (4430, 11780 e 8780 ng.g⁻¹ de sedimento, respectivamente) (Medeiros et al.,
14 2005).

15 Além disso, trabalhos têm mostrado que os sedimentos de determinados setores
16 do estuário da Lagoa dos Patos apresentam teores altos de óleos e graxas, notadamente
17 na região citada anteriormente, incluindo Canal de Acesso e Superporto (Baisch, 2000;
18 Baisch et al., 2000). Tais problemáticas somadas à alta atividade de navegação presente
19 no município, são responsáveis pelas emissões de PAHs (Garcia et al., 2010).

20

21 **1.3. Biomonitoramento e o uso de peixes como biomonitores**

22

23 Inicialmente, estudos envolvendo monitoramento tinham o enfoque voltado para
24 a detecção de contaminantes em compartimento abióticos de meios aquáticos, na coluna
25 d'água e no sedimento (Van der Oost et al., 1996), em seguida, a avaliação era feita pela
26 presença de contaminantes em elementos bióticos (Schmitt et al., 1999; Watanabe et al.,
27 1999). A vantagem de avaliar as respostas biológicas como indicadores de degradação
28 ambiental em comparação com medições físicas e químicas da água é que estas apenas
29 registram o momento da coleta e dessa forma, seria necessário um grande número de
30 dados para um monitoramento temporal eficiente (Pratt e Coler, 1976).

31 O monitoramento biológico pode ser passivo ou ativo. No biomonitoramento
32 passivo há técnicas de avaliações em campo, onde são analisadas as comunidades. Já o
33 ativo inclui a exposição de organismos realizados em laboratório com condições
34 controladas (Resh e Jackson, 1993). Atualmente, os estudos vêm utilizando organismos-

1 modelo, que são classificados como indicadores, sentinelas e monitores, com o propósito
2 de monitorar ecossistemas e analisar os efeitos dos contaminantes nos organismos
3 (Beeby, 2001).

4 Segundo a definição, espécies indicadoras apontam alterações nas estruturas
5 populacionais (presença e ausência da espécie) causadas por determinado impacto. Os
6 organismos sentinelas são usados para realização de análises químicas, com o propósito
7 de verificar as concentrações de contaminantes biodisponíveis na biota. E, por fim,
8 organismos monitores são aqueles que indicam efeitos internos ao serem expostos a
9 contaminantes, tais efeitos podem ser bioquímicos e histológicos, por exemplo (Beeby,
10 2001).

11 O biomonitoramento proporciona instrumentos para a identificação da presença
12 de poluentes capazes de causar danos ao ambiente e a saúde humana (Silva et al., 2003).
13 Há três principais casos que necessitam dessas ferramentas. Primeiramente, em situações
14 onde haja suspeitas de que existam espécies nativas ameaçadas. Em segundo lugar,
15 quando há problemas para a saúde humana em relação ao consumo de organismos
16 possivelmente contaminados e por fim, quando existir o interesse em conhecer a
17 qualidade ambiental (Silva et al., 2003).

18 No entanto, em situações onde o monitoramento seja utilizado somente para
19 determinar os níveis de contaminação presentes na água, esse processo acaba sendo
20 considerado insuficiente para classificar a qualidade de um ecossistema aquático. Assim,
21 no intuito de avaliar o destino dos elementos tóxicos em um ambiente aquático, é
22 importante realizar o biomonitoramento através de medidas de doses internas na biota
23 (Van der Oost et al., 1996). Para isso, diferentes estratégias vem sendo desenvolvidas
24 para detectar e prevenir impactos de poluentes em ecossistemas aquáticos (Silva et al.,
25 2001).

26 O uso de vertebrados em biomonitoramento ambiental origina resultados os quais
27 permitem um julgamento abrangente das condições de um ambiente impactado, visto que
28 há respostas distintas entre os organismos. Para obter bons resultados, os protocolos para
29 obter tais respostas diferem e por esse motivo devem ser específicos para cada grupo a ser
30 estudado, assim, é necessário que haja uma padronização antes das amostragens
31 definitivas (Oliveira Ribeiro et al., 1999).

32 Nos ambientes aquáticos, os peixes são considerados aliados importantes no
33 acompanhamento da qualidade da biota, servindo como biomonitores por apresentarem
34 mudanças na taxa de crescimento e maturação sexual, como na estrutura populacional

1 na presença de contaminantes, (Fragoso et al., 1998; Schulz e Martins-Junior, 2001).
2 incluindo PAHs (Xue and Warshawsky, 2005).

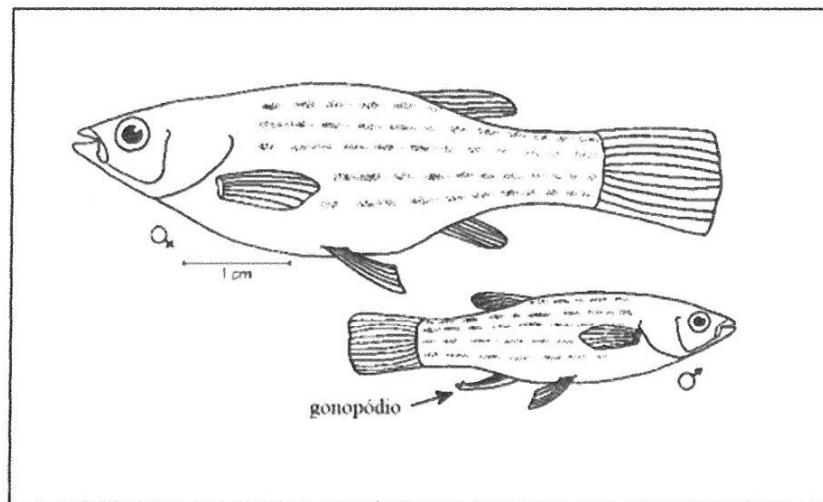
3 Todos os animais possuem enzimas de biotransformação. Em vertebrados, tais
4 enzimas estão presentes em altos níveis no fígado. Por exemplo, o complexo citocromo
5 P450 (CYP), que converte contaminantes orgânicos lipossolúveis em metabólitos
6 excretáveis solúveis em água (Livingstone, 1991). Os processos de biotransformação de
7 contaminantes em peixes vêm sendo alvo de estudos (Ortiz-Delgado et al., 2002; Rees
8 et al., 2003; Kilanowicz et al., 2009).

9 Dentre as inúmeras ordens de peixes, os Ciprinodontiformes recebem destaque
10 como biomonitores modelos (Clark e Di Giulio, 2012). Essa ordem possui uma
11 diversidade de famílias comportando cerca de 400 espécies descritas (Lévêque et al.,
12 2008). Alguns são conhecidos por seu pequeno tamanho e por serem abundantes, além
13 disso, são capazes de tolerar elevados níveis de toxicidade ambiental (Burnett et al.,
14 2007; Bosker et al., 2010; Clark e Di Giulio, 2012). Diante dessas características, o uso
15 de espécies como, *Jenynsia multidentata*, *Phalloceros caudimaculatus*, *Poecilia*
16 *vivipara*, *Poecilia latipinna* e *Fundulus heteroclistus*, têm sido sugeridas recentemente
17 em estudos ecotoxicológicos (Zanette et al., 2009; Ferreira et al., 2012; Dorrington et
18 al., 2012).

19 No Brasil, algumas espécies de Ciprinodontiformes são abundantes (Betito,
20 2006; May et al., 2007) e portanto poderiam ser utilizadas em estudos em
21 ecotoxicologia. Uma espécie representante desta ordem, pertencente comum da família
22 Anablepidae, é o peixe *Jenynsia multidentata*. Tal espécie ocorre do Rio Negro, na
23 Argentina até o estado do Rio de Janeiro, no Brasil (Ghedotti, 1998), sendo facilmente
24 localizada em todas as épocas do ano no extremo sul do Rio Grande do Sul (Mai et al.,
25 2005). Esta espécie, conhecida também popularmente por barrigudinho, é eurihalina
26 secundária de água doce, podendo ocorrer em corpos d'água doces ou estuarinos (Vieira
27 et al., 1998). Possuem tamanho pequeno, sendo que machos podem atingir até 6cm e
28 fêmeas podem atingir 12 cm (Garcia et al., 2004), e possuem tolerância a mudanças nas
29 condições de salinidade/temperatura o que torna essa espécie um organismo-modelo
30 promissor em estudos em campo e em laboratório (Mai, et al., 2005; Betito, 2006). O
31 hábito alimentar é omnívoro, ingerindo vegetais de fundo, como diatomáceas epífitas e
32 restos de vegetais em decomposição, além de poliquetos e anfípodes (Betito, 1984; Mai
33 et al., 2006).

1 São indivíduos de fácil identificação com corpo alongado, o ventre arredondado
2 com coloração escura no dorso e clara no ventre, possuem manchas escuras, curtas e
3 estreitas ao longo das laterais do corpo (Garcia et al., 2004). É uma espécie vivípara,
4 apresentando dimorfismo sexual externo entre machos e fêmeas e habitam áreas
5 poluídas e não poluídas (Hued e Bistoni, 2005) (Fig.3).

6 Determinadas espécies de Cyprinodontiformes, incluindo o *J. multidentata*,
7 possuem adaptações pouco usuais entre os teleósteos, além da viviparidade já
8 mencionada, há modificações morfológicas entre machos e fêmeas, a principal delas é a
9 modificação da nadadeira anal dos machos em um fino e alongado órgão copulatório,
10 com raios unidos formando o denominado gonopódio (Rahayu et al., 2013). Trata-se de
11 um órgão rígido, com tamanho máximo de 10 mm e com capacidade de regeneração
12 (Betito, 2006).



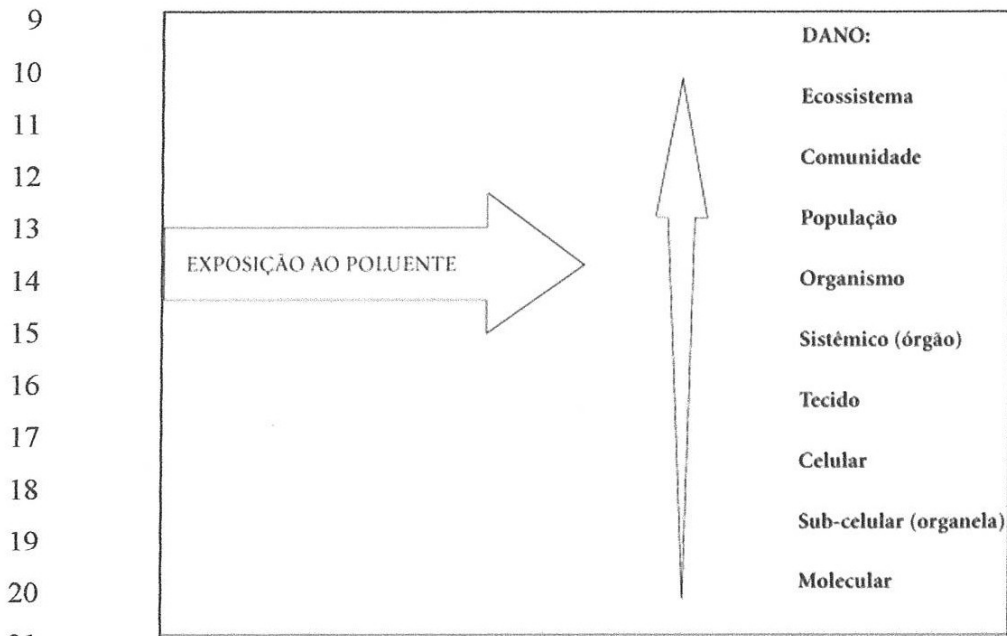
24 Figura 1. Desenho de Fêmea (♀) e macho (♂) de *Jenynsia multidentata* (Anablepidae).
25 A seta indica o gonopódio (Fischer, 1999).

26 1.4. Biomarcadores ambientais

27

28 A necessidade de avaliar as alterações causadas por contaminantes sobre os
29 organismos levou ao uso dos biomarcadores. Biomarcadores são alterações biológicas que
30 ocorrem a nível molecular, celular e/ou fisiológico em órgãos, tecidos e células de
31 organismos que expressam os efeitos tóxicos causados por contaminantes (Walker et al., 1996).
32 Os biomarcadores moleculares e bioquímicos refletem alterações em níveis mais baixos
33 de organização biológica (Huggett et al., 1992) podendo antecipar a degradação das

1 populações e ecossistemas (Rand et al., 1995) (Fig.1). Dessa forma, a fim de aprimorar
2 o monitoramento ambiental, o estudo pode ser realizado por meio dessas ferramentas,
3 que foram originalmente utilizadas no campo da medicina humana para detectar
4 patologias (Zanette et al., 2009). Biomarcadores moleculares possuem uma rápida
5 resposta, e portanto, são capazes de indicar os primeiros sinais de estresse ocasionado
6 por contaminantes (Adams, 2002). O uso de biomarcadores está ganhando espaço em
7 programas de monitoramento, e tornando-se de alta importância no campo da
8 ecotoxicologia (Huggett et al., 1992).



22 Figura 2. Representação esquemática da ordem sequencial de respostas à poluentes
23 dentro de sistemas biológico (Arias et al., 2007).

24

25 O uso de biomarcadores possui grande potencial para complementar as
26 metodologias atuais de determinação dos impactos causados por poluentes ambientais, e
27 pelas análises químicas convencionais (Shugart, 2005). Além disso, é possível
28 determinar, de acordo com a dose ou tempo de resposta, o alcance da disfunção que o
29 contaminante pode produzir (Huggett et al., 1992).

30 Os organismos realizam a metabolização de muitos contaminantes, sobretudo no
31 fígado (Klumpp et al., 2002). A eliminação de um contaminante pode ser realizada por
32 excreção da substância original ou daquela que sobrou biotransformação (Van der Oost et
33 al., 2003). A biotransformação é um conjunto de alterações químicas que os compostos
34 sofrem no organismo, geralmente por meio de processos enzimáticos, a fim de tornar os

1 compostos mais hidrossolúveis e assim, de mais fácil eliminação (Azevedo e Lima, 2003;
2 Schlenk et al., 2008a). Entretanto, com a biotransformação, algumas substâncias têm sua
3 toxicidade alterada, podendo tornar-se mais tóxicas aos organismos, como é observado
4 para certos PAHs (Van der Oost et al., 2003; Schlenk et al., 2008a).

5

6 **1.5. O biomarcador Citocromo P450 1A (CYP1A)**

7

8 Dentre as famílias de enzimas responsáveis pela metabolização de poluentes e
9 outros xenobióticos, pesticidas e PAHs (Nelson *et al.*, 1996), uma das principais, no
10 que se refere a versatilidade catalítica é a superfamília citocromo P450 (CYP)
11 (Parkinson, 2001). A atividade elevada de algumas isoformas pertencentes a esta família
12 pode indicar a exposição dos organismos a contaminantes, e por ainda, indicar o risco
13 da contaminação ambiental (Stegeman e Hahn, 1994). Em peixes, CYPs são
14 principalmente encontrado no fígado, rim, cérebro e intestino, bem como em outros
15 órgãos (Bucheli e Fent, 1995). A exposição dos organismos a poluentes orgânicos pode
16 ser verificada pela determinação dos níveis de CYPs nestes organismos (Wang et al.,
17 2010; Ferreira et al., 2012).

18 CYP é uma superfamília de hemoproteínas que possui inúmeras isoformas que
19 estão presentes em altas concentrações no fígado, ainda que sejam encontradas em
20 outros tecidos (Nakajima e Aoyao, 2000). Uma das funções de CYPs é a de transformar
21 moléculas lipofílicas em compostos mais polares, os quais podem ser eliminados do
22 organismo com maior facilidade (Busby et al., 1999). O prefixo CYP é empregado para
23 indicar o sistema Citocromo P450 sendo classificados dentro de família e subfamílias. O
24 número após o prefixo CYP indica a família (CYP1), enquanto que a letra após este
25 número indica a subfamília (CYP1A). O último numeral da nomenclatura designa a
26 isoenzima específica, dentro de uma dada subfamília (ex.: CYP1A4) (Audi e Pussi,
27 2000). A medição dos níveis da isoforma CYP1A é considerada uma das mais
28 importantes no monitoramento da poluição em ambientes aquáticos para contaminantes
29 como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs),
30 dioxinas (TCDD) e alguns pesticidas, por ser fortemente induzida por estes compostos
31 (Machala et al., 1997).

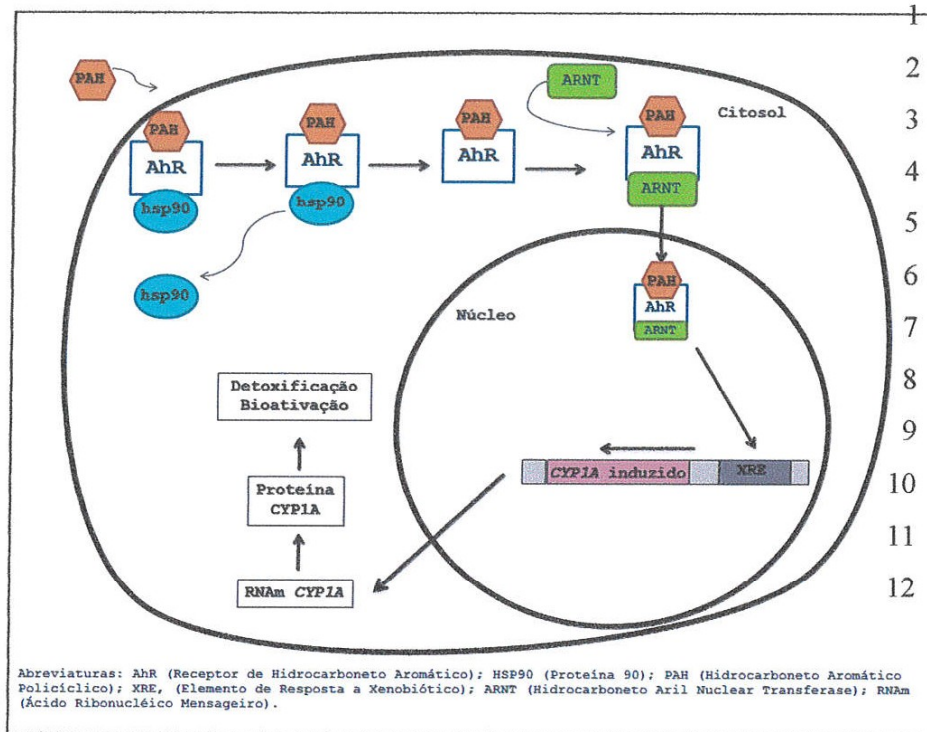
32 CYPs catalisam o metabolismo de numerosos xenobióticos e certas isoenzimas
33 da família CYP1 em peixes (CYP1A, CYP1B1 e CYP1C1) são altamente induzíveis por
34 certos contaminantes ambientais (Jönsson et al., 2010; Gao et al., 2011). A indução de

1 CYP1A é um biomarcador de exposição clássico a substâncias agonistas do receptor
2 AH (AHR; receptor de hidrocarbonetos aromáticos) em mamíferos, aves e peixes
3 (Honkakoski e Negishi, 2000).

4 O β -naftoflavona (BNF - 5,6 benzoflavona) é um PAH derivado sintético de um
5 composto natural de flavonóides, e possui a capacidade de induzir um forte aumento nos
6 níveis de CYP1A e causa efeitos diferentes sobre os outros membros do sistema de
7 monooxigenases CYP (DiGiovanni, 1990). Além de BNF ser um forte indutor de
8 CYP1, é um composto não-geotóxico, e parece não ter como alvo a indução de outras
9 famílias de CYP (Ito et al., 1996). Esse composto sintético é um potente agonista da
10 proteína receptora de hidrocarbonetos aromáticos (AhR) e induz CYP1A sem produzir
11 efeitos adversos. Por outro lado, PAHs como o benzo[a]pireno e PCB126 possuem o
12 mesmo efeito sobre o receptor AhR e CYP1A, porém são altamente tóxicos (Ferreira et
13 al., 2012).

14 O mecanismo de indução transcricional de *CYP1A* ocorre através da ativação do
15 receptor AhR. Quando a proteína AhR se liga a estes agonistas, o novo complexo
16 formado AhR-agonista move-se para o núcleo e liga-se a um elemento de resposta à
17 xenobióticos (XRE) na região promotora de certos genes, e então é desencadeada a
18 ativação transcricional dos mesmos, dentre os quais se destaca o gene *CYP1A*. Tal
19 ativação gênica causa um aumento na expressão e atividade da enzima CYP1A, e na
20 metabolização/bioativação de compostos orgânicos (Nebert 1989; Safe e Krishnan,
21 1995).

22 Portanto, a indução do *CYP1A* é uma resposta sensível à exposição dos
23 organismos a determinados compostos químicos, como os PAHs. Há a liberação da
24 proteína hsp90 e esse complexo se liga a outra enzima, a hidrocarboneto aril nuclear
25 transferase (ARNT) e com isso ocorre a transferência para dentro da célula (Stegeman e
26 Hahn, 1994) (Fig. 3).



13 Figura 3. Desenho esquemático do mecanismo de indução do gene *CYP1A* na presença
 14 de hidrocarboneto aromático policíclico.

15

16 Estudos com espécies de Ciprinodontiformes, *Fundulus heteroclitus*, *Poecilia*
 17 *vivipara* e *Jenynsia multidentata*, evidenciam que os níveis de transcrição gênica de
 18 *CYP1A* são alterados em função da exposição a contaminantes orgânicos (Elskus et al.,
 19 1999; (Ferreira et al., 2012). Além disso, pesquisas realizadas com peixes de outras
 20 ordens como por exemplo, salmão (*Salmo salar*) e baiacu (*Takifugu obscurus*)
 21 evidenciaram a indução de *CYP1A* em diferentes órgãos (cérebro, olhos, brânquias,
 22 gônadas, coração, intestino, rim, fígado, músculo e pele) (Ress et al., 2005; Kim et al.,
 23 2008). Os valores máximos de indução da transcrição gênica de *CYP1A* podem variar
 24 dependendo do tempo de exposição ao composto e do órgão analisado em questão (Kim
 25 et al., 2008).

26

27 1.6. Anestesia e o uso de biópsia como método não-letal

28

29 O surgimento da bioética em 1971, e o reconhecimento da sua necessidade nos
 30 campos da ciência da vida, são eventos que se destacam no empasse entre o avanço
 31 tecnológico e as reflexões morais. A necessidade de uma conciliação entre essas duas

1 vertentes é evidenciada por meio da crescente procura por novos conhecimentos e
2 metodologias alternativas na experimentação animal (Azevedo, 1998).

3 A experimentação animal permite o desenvolvimento do conhecimento biológico,
4 do bem estar do homem e dos animais. Diante dos avanços nesta área, o conceito e a
5 utilização de espécies-modelo desperta grande interesse, por possuir capacidade de
6 aprofundar a pesquisa, a fim de evitar ou diminuir o sofrimento dessas espécies. Isso
7 acarretou o estabelecimento de inúmeras normativas (Minteer e Collins, 2005). A fim de
8 prever os potenciais efeitos de determinados compostos e procedimentos, a utilização de
9 animais em experimentos, envolve a responsabilidade pelo bem-estar animal (Ilar, 1996).

10 No Brasil, a referência à utilização de animais na realização de pesquisas e
11 atividade de ensino foi implementada no ano de 2008 a Lei nº11.794, denominada Lei
12 Arouca. Essa lei foi pormenorizada pelo Decreto nº 6.899/09, a qual estabelece que é
13 responsabilidade das Comissões de Ética Institucionais ao Uso de Animais (CEUA)
14 controlar as atividades de ensino e pesquisa que estejam acontecendo nas universidades
15 (Oliveira et al. 2013).

16 Entre os princípios éticos específicos para assegurar o bem estar animal, além de
17 possibilitar o mínimo de manipulação, áreas de alojamento especiais para o propósito
18 (Tomás e Garrido, 2006) e reduzir o número de animais utilizados numa determinada
19 experiência (Russel e Burch, 1992), há a questão do uso devido de anestésicos nos
20 animais de experimentação (Paton, 1993).

21 A anestesia é definida como o estado biológico reversível de indução por um
22 agente externo que resulta na perda parcial ou total da sensibilidade e do controle
23 neuromotor (Summerfelt e Smith, 1990). A tricaina metano-sulfonato (MS-222) tem sido
24 um dos anestésicos mais usados nos procedimentos experimentais em animais aquáticos,
25 especialmente em peixes, desde o seu surgimento em 1967. A elevada solubilidade desse
26 anestésico torna-o apropriado para a sua utilização tanto em água doce como em água
27 salgada (Ortuno et al., 2002; Coyle et al., 2004; Maricchiolo e Genovese, 2011). Os
28 efeitos da tricaina são controversos, alguns estudos demonstram nenhuma relação entre o
29 peso corporal e o tempo de indução e a recuperação, enquanto outros sugerem que tal
30 relação é existente (Houston et al., 1976; Zahl et al., 2009). Além disso, há relatos de que
31 a MS-222 pode interferir em certas enzimas de biotransformação de contaminantes
32 ambientais, como por exemplo o citocromo P450 (Topic Popovic et al., 2012).

33 Em peixes, o processo anestésico pode ser dividido em quatro fases (I-IV) com
34 suas respectivas características: (I) sedação leve com ligeira perda de reação visual e

1 estímulos com frequência respiratória normal, (II) narcose em fase de excitação pode
2 preceder um aumento da frequência respiratória, profundidade da narcose com perda
3 total de equilíbrio, (III) fase com maior diminuição da frequência respiratória e perda de
4 atividade, indicada para procedimento cirúrgico e (IV) colapso medular com perda total
5 do movimento seguido por parada cardíaca (Brown, 1993; Coyle et al., 2004).

6 Em geral, a análise da expressão de CYPs requer amostras biológicas destrutivas
7 (letais), como por exemplo, brânquias e fígado em peixes, o que para populações
8 ameaçadas implicaria diretamente em impactos para a espécie (Ress et al., 2005). A fim
9 de minimizar esse efeito o uso de biópsias não-letais são consideradas alternativa em
10 diferentes grupos animais. Em mamíferos marinhos esse método é usado retirando
11 pequenas fatias de pele ou gordura (Garrick et al., 2006; Miller et al., 2005). Em peixes
12 há estudo utilizando métodos *in vitro* com linhagens de células hepáticas de truta-arco-
13 íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Billard, 2004) e relatos de técnicas sub-letais para estimar
14 níveis transcricionais de *CYP* em brânquias de salmão (*Salmo salar*) (Ress et al., 2005).
15 Porém, estudos que tenham utilizado métodos não-letais para análise de biomarcadores,
16 usando peixes-modelo sul-americanos de pequeno porte ainda são escassos, ou
17 inexistentes, na literatura.

18 Uma ciência que envolve essas importantes vertentes, bioética e o uso de
19 anestésicos em experimentos, é chamada Ecotoxicologia, a qual estuda os efeitos das
20 substâncias, naturais ou sintéticas, sobre os organismos vivos, animais ou vegetais,
21 terrestres ou aquáticos, incluindo a interação das substâncias com a biota (Zagatto e
22 Bertolotti, 2006). Essa área de pesquisa surgiu como uma ferramenta no monitoramento
23 ambiental, baseada geralmente na resposta dos organismos a determinados compostos
24 (Azevedo e Chasin, 2003).

25 No presente trabalho verificamos os níveis de indução órgão-específico do gene
26 *CYP1A* de *J. multidentata* frente ao PAH indutor β -naftoflavona em diferentes tempos
27 de exposição a fim de determinar as combinações tempo/órgão que causam indução
28 máxima do gene. Avaliou-se também o possível efeito do anestésico tricaina nos níveis
29 de indução do gene alvo e estabeleceu-se a utilização de técnicas não-letais que poderão
30 ser utilizadas em biomonitoramento em estudos de campo.

1 **2. OBJETIVO GERAL**

2

3 Avaliar diferentes aspectos da indução transcricional do biomarcador *CYP1A* no
4 peixe *Jenynsia multidentata* como: resposta temporal, efeitos da administração de
5 anestésico e uso de biopsia de nadadeiras, para fins de biomonitoramento da
6 contaminação por contaminantes orgânicos.

7

8 **2.1. Objetivos específicos**

9

- 10 • Verificar os níveis de indução órgão-específico do gene *CYP1A* em
11 *J. multidentata* pela 1 μ M do indutor β -naftoflavona (BNF) nos tempos de
12 exposição 1, 2, 4, 8, 24, 48 e 96 horas;
- 13 • Avaliar o efeito da aplicação do anestésico tricáína-metano-sulfonato (MS-222)
14 nos níveis de indução do gene *CYP1A* em nadadeiras dorsal, caudal e anal
15 (gonopódio) de *J. multidentata*, bem como, em órgãos classicamente usados em
16 ecotoxicologia, como fígado e brânquia;
- 17 • Verificar o uso de um método não-letal de biopsia de nadadeiras dorsal, caudal
18 e anal (gonopódio) de *J. multidentata* para análise do biomarcador *CYP1A*;

1 **3. REFERÊNCIAS**

2

3

4 Aas, E., Beyer, J., Jonsson, G., Reichert, W.L. & Andersen, O.K., 2001. Evidence of
5 uptake, biotransformation and DNA binding of polycyclic aromatic hydrocarbons in
6 Atlantic cod and cormorant wrasse caught in the vicinity of an aluminium works.
7 *Marine Environmental Research* 52, 213-229.

8 Adams, M., 2002. Biological indicators of Aquatic ecosystem stress. Maryland:
9 American Fisheries Society Bethesda, USA, p. 644.

10 Albers, P. H., 1995. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons.
11 In: Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Cairns, J (Eds.). Handbook of
12 ecotoxicology. Boca Raton : Lewis publishers, p. 330-355.

13 Almeida, M. T. A., Baumgarten, M. G. Z., Rodrigues, R. M. S., 1993. Identificação
14 das possíveis fontes de contaminação das águas que margeiam a cidade do Rio
15 Grande (RS). Série Documentos Técnicos - Oceanografia. Editora da FURG 6,
16 34.

17 Arias, A. R. L., Buss, D. F., Albuquerque, C. D., Inácio, A. F., Freire, M. M., Egler,
18 M., Baptista, D. F., 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e
19 no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e*
20 *Saúde Coletiva* 12 , 61-72.

21 Audi, E., Pussi, F., 2000. Isoenzimas do CYP450 e Biotransformação de drogas.
22 *Acta. Scientiarum* 22 , 599-604.

23 Azevedo, E.E.S., 1998. Ensino de Bioética: um desafio transdisciplinar. The teaching
24 of Bioethics: a transdisciplinary challenge. *Interface comun. Saúde Educação* 2 ,
25 127-137.

26 Azevedo, F. A., Chasin, A.A.M., 2003. As bases toxicológicas da ecotoxicologia.
27 São Carlos – SP: Editora Rima.

28 Azevedo, F. A., Lima, I. V., 2003. Toxicocinética. In: Azevedo, F. A. e Chasin, A.
29 A. M. (Eds.). As bases toxicológicas da ecotoxicologia. Editora Rima, São
30 Carlos, p. 27-89.

31 Beeby, A., 2001. What do sentinels stand for? *Environmental Pollution* 112 , 85-298.
32 Baisch, P., Zamboni, A., Cordeiro, L. H., Rocha, A. C., 2000. Avaliação preliminar dos
33 níveis de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos nos sedimentos do estuário da

- 1 Lagoa dos Patos, Rio Grande, RS. In: XIII Semana Nacional de Oceanografia 2000,
2 Itajaí. Resumos Expandidos, 302-304.
- 3 Baisch, P., 2000. Estudo dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos. Caracterização
4 da Qualidade dos Sedimentos da Área de Dragagem do Porto da Cidade de Rio
5 Grande. Porto Novo, Canal de Acesso, Superporto e Molhes. Parte II. SUPRG.
6 Superintendência do Porto da Cidade de Rio Grande. LOG/DEGEO/FURG, p. 24.
- 7 Betito, R., 2006. Comparação da complexidade das adaptações bioecológicas de dois
8 peixes (*Jenynsia multidentata* e *Poecilia vivipara*) Cyprinodontiformes no
9 estuário da Lagoa dos Patos (RS - Brasil). Revista Didática Sistêmica 3, 71-100.
- 10 Bosker, T., Hewitt, L.M., Munkittrick, K.R., Maclatchy, D.L., 2010. Validation of a
11 refined short-term adult fish reproductive test with improved power for
12 mummichog (*Fundulus heteroclitus*) to test complex effluents. Ecotoxicology
13 and Environmental Safety 73, 1596-1601.
- 14 Brown, L. A., 1993. Anaesthesia and restraint. Em: Fish medicine, M. K. Stoskopf
15 (Ed.). W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA, USA, p. 79-90.
- 16 Bucheli, T. B., Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for
17 environmental contamination in aquatic ecosystems. Critical Reviews in
18 Environmental Sciences and Technology 25, 201-268.
- 19 Burnett, K.G., Bain, L.J., Baldwin, W.S., Callard, G.V., Cohen, S., Di Giulio, R.T.,
20 Evans, D.H., Gomez-Chiarri, M., Hahn, M.E., Hoover, C.A., Karchner, S.I.,
21 Katoh, F., Maclatchy, D.L., Marshall, W.S., Meyer, J.N., Nacci, D.E., Oleksiak,
22 M.F., Ress, B.B., Singer, T.D., Stegeman, J.J., Towle, D.W., Van Veld, P.A.,
23 Vogelbein, W.K., Whitehead, A., Winn, R.N., Crawford, D.L., 2007. *Fundulus* as
24 the premier teleost model in environmental biology: opportunities for new
25 insights using genomics. Comparative Biochemistry Physiology Parte D:
26 Genomics and Proteomics 2, 257-286.
- 27 Busby, W.F., Ackermann, J.M., Crespi, C.L., 1999. Effect of methanol, ethanol,
28 dimethyl sulfoxide and acetonitrile on *in vitro* activities of cDNA-expressed
29 human cytochromes P-450. Drug Metabolism and Disposition 27, 246-249.
- 30 Carriger, J.F., Hoang, T.C., Rand, G.M., Gardinali, P.R., Castro, J., 2011. Acute
31 Toxicity and Effects Analysis of Endosulfan Sulfate to Freshwater Fish Species.
32 Archives of Environmental Contamination and Toxicology 60, 281-289.
- 33 Clark, B.W., Di Giulio, R.T., 2012. *Fundulus heteroclitus* adapted to PAHs are
34 cross-resistant to multiple insecticides. Ecotoxicology 21, 465-474.

- 1 Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M., Espindola, E. L., 2008. A toxicidade em
2 ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova* 31 , 1820-
3 1830.
- 4 Coyle, S. D., Durborow, R. M., Tidwell, J. H., 2004 Anesthetics in aquaculture.
5 Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) 3900, 1-6.
- 6 DiGiovanni, J., 1990. Inhibition of chemical carcinogenesis. In: *Chemical*
7 *Carcinogenesis and Mutagenesis*, Copper CS, Grover PL (eds). Springer Verlag,
8 Berlin, 159-253.
- 9 Dorrington, T., Zanette, J., Zacchi, F.L., Stegeman, J.J., Bainy, A.C.D., 2012. Basal
10 and 3-methylcholanthrene-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and
11 1C genes in the Brazilian guppy, *Poecilia vivipara*. *Aquatic Toxicology* 124-125
12 C:106-113.
- 13 Eisler, R., 1987. Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and
14 invertebrates: a synoptic review. Patuxent Wildlife Research Center, Laurel, MD
15 (USA).
- 16 Elskus, A. A., Monosson, E., McElroy, A.E., Stegeman, J.J., Woltering, D.S., 1999.
17 Altered CYP1A expression in *Fundulus heteroclitus* adults and larvae: a sign of
18 pollutant resistance? *Aquatic Toxicology* 45, 99-113.
- 19 Ferreira, R.S., Monserrat, J.M., Ferreira, J.L.R., Kalb, A.C., Stegeman, J.J., Bainy,
20 A.C.D., Zanette, J., 2012. Biomarkers of organic contamination in the south
21 american fish *Poecilia vivipara* and *Jenynsia multidentata*. *Journal of Toxicology*
22 *and Environmental Health, Part A*, 75, 1-11.
- 23 Fischer, L.G. 1999. Guia ilustrado para identificação dos peixes ósseos do estuário da
24 Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Monografia de Graduação em Oceanologia, Fundação
25 Universidade Federal do Rio Grande, p.124.
- 26 Fleming, L.E, Broad, K., Clement, A., Dewailly, E., Elmir, S., Knap, A., 2006.
27 Oceans and human health: emerging public health risks in the marine
28 environment. *Marine Pollution Bulletin* 53, 545-560.
- 29 Förstner, U., Wittmann, G.T.W., 1981. *Metal Pollution in the Aquatic Environment*.
30 Second Revised Edition. Springer – Verlag. Berlin Heidelberg New York, p.86.
- 31 Fragoso, N. M., Parrot, J. L., Hahn, M. E, Hodson, P. V., 1998. Chronic retene
32 exposure causes sustained induction of CYP1A activity and protein in rainbow
33 trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 17,
34 2347-2353.

- 1 Gao, K., Brandt, I., Goldstone, J.V., Jönsson, M.E., 2011. Cytochrome P450 1A, 1B,
2 and 1C mRNA induction patterns in three-spined stickleback exposed to a
3 transient and a persistent inducer. *Comparative Biochemistry Physiology Part C:
4 Toxicology Pharmacology* 154 42–55.
- 5 Garcia, M.R., Mirlean, N., Baisch, P.R., Caramão, E.B., 2010. Assessment of
6 polycyclic aromatic hydrocarbon influx and sediment contamination in an
7 urbanized estuary. *Environmental Monitoring and Assessment* 168, 269-276.
- 8 Geffard, O., Geffard, A., His, E., Budzinski, H., 2003. Assessment of the
9 Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic
10 aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos
11 and larvae, *Marine Pollution Bulletin* 46, 481-490.
- 12 Ghedotti, M.J., Weitzman, S.H., 1998. A new species of *Jenynsia*
13 (Cyprinodontiformes: Anablepidae) from Brazil with comments on the
14 composition and taxonomy of the genus. *Natural History Museum and
15 Department of Systematics and Ecology* 179, 1-25.
- 16 Grisolia, C.K., 2005. Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Riscos ao homem
17 e ao meio ambiente, pela avaliação de genotoxicidade, carcinogenicidade e
18 efeitos sobre a reprodução. Brasília: Editora Universidade de Brasília.
- 19 Holt, M. S., 2000. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater
20 environment. *Food and Chemical Toxicology* 38, 21-27.
- 21 Honkakoski, P., Negishi, M., 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by
22 nuclear receptors. *Biochemical Journal* 347, 321.
- 23 Houston, A. H., Woods, R. J., 1976. Influence of temperature upon tricaine methane
24 sulphonate uptake and induction of anesthesia in rainbow trout (*Salmo
25 gairdneri*). *Comparative Biochemistry Physiology* 54C, 1–6.
- 26 Hued, A.C., Bistoni, M.A., 2005. Development and validation of a biotic index for
27 evaluation of environmental quality in the central region of Argentina.
28 *Hydrobiologia* 543, 279–298.
- 29 Huggett, R. J., Kimerie, R. A., Mehrie Jr., P. M., Bergman, H. L., 1992. Biomarkers:
30 Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress.
31 Boca Raton: Lewis Publishers.
- 32 Ilar, N.R.C., 1996., *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington,
33 D.C.: National Academic Press.

- 1 Ito, N., Hasegawa, R., Imaida, K., Hirose, M., Shirai, T., 1996. Mediumterm liver
2 and multi-organ carcinogenesis bioassays for carcinogens and chemopreventive
3 agents. *Experimental and Toxicologic Pathology* 48, 113-119.
- 4 Jönsson, M.E., Gao, K., Olsson, J.A., Goldstone, J.V., Brandt, I., 2010. Induction
5 patterns of new *CYP1* genes in environmentally exposed rainbow trout. *Aquatic*
6 *Toxicology* 98 , 311–321.
- 7 Kantin, E., Costa, N. R., Baptista, J. R., Philomena, A.L., Giesta, S. M., Niencheski, L.
8 F., 1980. Contaminação das águas ao redor da cidade do Rio Grande: óleos e graxas.
9 *Ciência e Cultura* 33 , 236-239.
- 10 Kilanowicz, A., Srrzypinska,-Gawrysiak, M., Sapota, A., Galoch, A., Daragó, A.,
11 2009. Subacute toxicity of polychlorinated naphthalenes and their effect on
12 cytochrome P-450. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 650-657.
- 13 Kim, J.H., Raisuddin, S., Ki, J.S., Lee, J.S., Han., K.N., 2008. Molecular cloning and
14 β -naphthoflavone-induced expression of a cytochrome P450 1A (*CYP1A*) gene
15 from an anadromous river pufferfish, *Takifugu obscurus*. *Marine Pollution*
16 *Bulletin* 57, 433–440.
- 17 Klumpp, D. W., Huasheng, H., Humphrey, C., Xinhong, W., Cordi, S., 2002. Toxic
18 contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. I.
19 Organic pollutants in mussel and fish tissues. *Marine Pollution Bulletin* 44, 752-
20 760.
- 21 Lévêque, C., Oberdoff, T., Paugy, D., Stiassny, M.L.J., Tedesco, P.A., 2008. Global
22 diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 545-567.
- 23 Livingstone, D.R., 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In:
24 D.F. Houlihan, D.R. Livingstone, and R.F. Lee (eds.), *Advanced in comparative*
25 *and environmental physiology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 45-185.
- 26 Lyons, G., 1998. Briefing on Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) Submitted by the
27 World Wide Fund for Nature (WWF). Copenhagen: Working Group on Sea-
28 Based Activities (SEBA), p. 16-20.
- 29 Machala, M., Nezveda, K., Petrivalský, M., Jarosová, A, Piaâcka, V., Svobodová, Z.,
30 1997. Monooxygenase activities in carp as biochemical markers of pollution by
31 polycyclic and polyhalogenated aromatic hydrocarbons: choice of substrates and
32 effects of temperature, gender and capture stress. *Aquatic Toxicology* 37, 113-
33 123.

- 1 Maggione, T., Hued, A.C., Monfererrán, M.V., Bonansea, R.I., Galanti, L.N., Amé,
2 M.V., 2012. Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution in the
3 Middle-Lower Basin of the Suquia River (Córdoba, Argentina). Archives of
4 Environmental Contamination and Toxicology 63, 337-353.
- 5 Mai, A.C.G., Garcia, A.M., Vieira, J.P., 2005. Influência da salinidade no
6 crescimento de juvenis do barrigudinho *Jenynsia multidentata*, Jenyns, 1842.
7 Revista Brasileira de Zoologia 22 , 780-783.
- 8 Mai, A.C.G, Garcia, A. M., Vieira, J. P., 2006. Ecologia alimentar do barrigudinho
9 *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842) (Pisces: Cyprinodontiformes) no estuário da
10 Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. Comunicações do Museo de Ciências
11 e Tecnologia da PUCRS, Serie Zoologia 19 , 3-18.
- 12 Mai, A.C.G., Garcia, A.M., Vieira, J.P., Mai, M.G., 2007. Reproductive aspects of
13 the one-sided livebearer *Jenynsia multidentata* (Jenys, 1842)
14 (Cyprinodontiformes) in the Patos Lagoon estuary, Brazil. Pan-American Journal
15 of Aquatic Sciences 2 , 40-46.
- 16 Maricchiolo, G., Genovese, L., 2011. Some contributions to knowledge of stress
17 response in innovative species with particular focus on the use of the
18 anaesthetics. Journal of Marine Biology 5, 24-33.
- 19 Medeiros, P.M., Bicego, M.C., Castelão, R.M., Rosso, C.D., Fillmann, G., Zamboni,
20 A.J., 2005. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos
21 Lagoon Estuary, Brazil. Environment International 31, 77-87.
- 22 Minter, B.A., Collins, J. P., 2005. Ecological ethics: building a new tool kit for
23 ecologists and biodiversity managers. Conservation Biology 19 , 1803-1812.
- 24 Nakajima, T., Aoyama, T., 2000. Polymorphism of drug-metabolizing enzymes in
25 relation to individual susceptibility to industrial chemicals. Industrial Health,
26 Kawasaki 38 , 143-152.
- 27 Nakhla, G., 2003. Biokinetic Modeling of in Situ Bioremediation of BTX
28 Compounds – Impact of Process variable and Scaleup Implications. Water
29 Research 37, 1296 – 1307.
- 30 Nebert, D.W., 1989. The Ah locus: Genetic differences in toxicity, cancer, mutation,
31 and birth defects. Critical Reviews in Toxicology 20, 153-174.
- 32 Neiff, J.J., 1999. El régimen de pulsos em rios y grandes humedales de Sudamérica.
33 P.97-145. Em: Malvarez, A.I. e P. Kandus (eds.): Tópicos sobre grandes
34 humedales sudamericanos. ORCYT-MAB (UNESCO), p.224.

- 1 Oliveira Ribeiro, C. A., Rouleau, C., Pelletier, É., Audet, C., Tjälve, H., 1999.
2 Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Artic charr (*Salvelinus*
3 *alpinus*). Environmental Science e Technology 33, 902-907.
- 4 Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C., Behrens, A., Canales, M. L. G., Segner, H.,
5 2002. Expression, cellular distribution and induction of cytochrome P4501A
6 (*CYP1A*) in gilthead seabream, *Sparus aurata*, brain. Aquatic Toxicology 60,
7 269-283.
- 8 Ortuno, J., Esteban, M. A., Meseguer, J., 2002. Effects of four anaesthetics on the
9 innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and
10 Shellfish Immunology 12, 49–59.
- 11 Parkinson, A., 2001. Biotransformation of xenobiotics. Em: KLAASSEN, C.D., ed
12 Casarret e Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 6ªed. New York.
13 McGraw-Hill, p. 133-224.
- 14 Paton, W., 1993. Man and Mouse. Animals in Medical Research. Oxford: Oxford
15 University Press, p. 129.
- 16 Rahayu, D.A., Listyorini, D., Ibrohim., 2013. Morphological Study to Improve
17 Identification Toward Poeciliidae Family Based on Gonopodium Structures and
18 Morphometric Analysis. The Journal of Tropical Life Science 3 , 91–95.
- 19 Rees, C. B., McCormick, S. D., Heuvel, J. P. V., Li, W., 2003. Quantitative PCR
20 analysis de *CYP1A* induction in atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquatic
21 Toxicology 62, 67-78.
- 22 Reible, D.D., Popov, V., Valsaraj, K.T., Thibodeaux, L.J., Lin, F., Dikshit, M.,
23 Todaro, M.A., Fleeger, J.W., 1996. Contaminant fluxes from sediment due to
24 tubificid oligochaete bioturbation. Water Research 30, 704-714.
- 25 Safe, S., Krishnan, V. 1995. Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon
26 (Ah) receptor-mediated gene expression. Archives of Toxicology 17, 99–115.
- 27 Saunders, D. L., Meeuwig, J. J., Vicent, C. J., 2002. Freshwater protected areas:
28 Strategies for conservation. Conservation Biology 16, 30–41.
- 29 Schlenk, D., Handy, R., Steinert, S., Depledge, H., Benson, W., 2008a.
30 Biotransformation in fishes. Em: Di Giulio, R. T., Hinton, D.E. (Eds.). The
31 Toxicology of Fishes 153-234.
- 32 Schmitt, C. J.; Zajicek, J. L.; May, T. W., Cowman, D. F., 1999. Organochlorine
33 residues and elemental contaminants in U.S. freshwater fish, 1976-1986:

- 1 National Contaminant Biomonitoring Program. *Reviews of Environmental*
2 *Contamination and Toxicology* 162, 43-104.
- 3 Schulz, U. H., Martins-Junior, H., 2001. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water
4 pollution of Rio dos Sinos, RS, Brasil. *Brazilian Journal of Biology* 61, 1-8.
- 5 Scott, D.A., Carbonell, M., 1986. *Inventario de humedales de la Región Neotropical.*
6 IWRB Slimbridge e UICN Cambridge.
- 7 Shaw, I. C., Chadwick, J., 1998. *Principles of Environmental Toxicology*, Taylor e
8 Francis: Philadelphia.
- 9 Shugart, L.R, 2005. Biomarker Environmental, Em: *Encyclopedia of Toxicology*,
10 Wexler P.,(Editor in Chief), Elsevier, New York, p. 287-290.
- 11 Silva, C. A. R., Rainbow, P. S., Smith, B. D., Santos, Z. L., 2001. Biomonitoring of
12 trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster
13 *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. *Water Research* 35 , 4072-4078.
- 14 Silva, J., Heiser, V., Andrade, V., 2003. Biomonitoramento ambiental. Em: Silva, J.,
15 Erdtmann, B., Henriques, J. A. P. (Eds). *Genética toxicológica*. Porto Alegre,
16 Alcance, p. 167-174.
- 17 Stegeman, J.J., Hahn, M., 1994. E. Biochemistry and molecular biology of
18 monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of
19 cytochrome P450 in aquatic species. *Aquatic toxicology: molecular, biochemical,*
20 *and cellular perspectives* 87, 206.
- 21 Summerfelt, R. C., Smith, L. S., 1990. Anesthesia, surgery, and related
22 techniques. *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda,
23 Maryland, 8, , p. 2.
- 24 Thurman, H. V., Trujillo, A. P., 1999. *Essentials of oceanography*. New Jersey:
25 Prentice Hall, p. 527.
- 26 Tomás, G.M., Garrido, A. 2001. *Manual de Bioética*. 2da reimpressão. Cap. 21.
27 Murcia: Editorial Ariel p. 311-22.
- 28 Topic Popovic, N., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Barisic, J., Jadan, M.,
29 Persin Berakovic, A., Sauerborn Klobucar, R., 2012. Review Tricaine methane-
30 sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. *Journal Applied Ichthyology*
31 28, 553–564.
- 32 USEPA, 1995. United States Environmental Protection Agency. *Risk Assessment*
33 *Handbook: Human Health Evaluation*. Manual N°200-1-4. Washington, DC.

- 1 Van Der Oost, R. V. D.; Goksoyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N. P. E.,
2 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II
3 Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology* 36,
4 189-222.
- 5 Van Der Oost, R. V. D., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation
6 and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental*
7 *Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- 8 Vieira, J.P., Castelo, J.P., Pereira, L.E., 1998. Os ecossistemas costeiros e marinho do
9 extremo sul do Brasil. *Ictiofauna*, Rio Grande, Ed. Ecoscientia, pp. 341.
- 10 Wang, Lu., Camus, A.C., Dong, W., Thornton, C., Willet, K. L., 2010. Expression
11 of CYP1C1 and CYP1A in *Fundulus heteroclitus* during PAH-induced
12 carcinogenesis. *Aquatic Toxicology* 99, 439-447.
- 13 Watanabe, R.; Coler, A., Paz, R. J., 1999. The implementation of a regional
14 biomonitoring program in northeast Brazil. *Aquatic Ecosystem Health and*
15 *Management* 2, 187-189.
- 16 Zagatto, P.A., Bertoletti, E., 2006. *Ecotoxicologia aquática – Princípios e*
17 *Aplicações*. Editora Rima, São Carlos., p.464.
- 18 Zahl, I. H., Kiessling, A., Samuelsen, O. B., Hansen, M. K., 2009. Anaesthesia of
19 Atlantic cod (*Gadus morhua*) – Effect of preanaesthetic sedation, and importance
20 of body weight, temperature and stress. *Aquaculture* 295, 62-69.
- 21 Zanette, J., Jenny, M.J., Goldstone, J.V., Woodin, B.R., Watka, L.A., Bainy, A.C.D.,
22 Stegeman.J.J., 2009. New cytochrome P450 1B1, 1C2 and 1D1 genes in the
23 killifish *Fundulus heteroclitus*: Basal expression and response of five killifish
24 CYP1s to the AHR agonist PCB126 *Aquatic Toxicology* 93, 234-243.

1 **Beta-Naphthoflavone-Induced Expression of *CYP1A* in the Guppy *Jenynsia***
2 ***multidentata*: Time-Dependent Response, Tricaine MS-222 Effect and Fin**
3 **Analysis.**

4
5 Debora P. Pinto ¹, Cíntia C. Chivittz ¹, Roger S. Ferreira ¹, Mauricio S. Sopezki ²,
6 Juliano Zanette ^{1,2,*}

7
8 ¹ Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais,
9 Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande –FURG, Rio
10 Grande, RS 96203-900, Brazil; ² Programa de Pós-graduação em Ciências
11 Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas,
12 Universidade Federal do Rio Grande –FURG, Rio Grande, RS 96203-900, Brazil

13

14 **Number of Tables: 0**

15 **Number of Figures: 3**

16

17 ***Correspondence to:**

18 Juliano Zanette
19 Universidade Federal do Rio Grande (FURG)
20 Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
21 Av. Itália, Km 8, Campus Carreiros
22 Rio Grande, RS, Brasil
23 96203-900
24 Phone: +55 53 32935196
25 Email: julianozanette@furg.br
26

1 **Abstract**

2 The cytochrome P450 1A (CYP1A) evaluation in fish is used as a biomarker of
3 exposure to organic contaminants such PAHs, PCBs and dioxins in the aquatic
4 environment. Waterborne exposure of fish and biopsied fins to the prototypical aryl
5 hydrocarbon receptor (AHR) agonist beta-naphthoflavone (BNF; 1 μ M) was
6 employed to characterize different aspects of *CYP1A* induction in the South-
7 American guppy *Jenynsia multidentata*. The *CYP1A* induction in gill, liver and anal
8 fin (gonopodium) was elicited in the first hour after fish waterborne exposure to
9 BNF, and remained after 2, 4, 8, 24, 48 and 96 h, comparing to control (DMSO
10 vehicle; $p < 0.05$). The organ-specific temporal pattern of induction was marked by an
11 earliest peak response in fin than liver. The *CYP1A* levels reached a peak in
12 gonopodium at 4 h (~ 34- fold control) and maximum levels in liver from 24 h to 96
13 h of exposure (~50- fold control). *CYP1A* basal level and induction to BNF exposure
14 were not affected by the chemical anesthetic procedure (fish immersion in 100
15 mg.mL⁻¹ tricaine MS-222 during 2-5 min) in gill, liver, gonopodium, dorsal and tail
16 fin ($p < 0.05$). The use of a non-lethal assay consisting of an 4-h exposure of small
17 pieces of biopsied fins to BNF, caused high *CYP1A* induction in tail and anal fins (~
18 49-fold and ~ 69-fold, respectively), but not in dorsal fin, comparing to control. This
19 is possibly the first study showing that 1-h waterborne exposure to an AHR agonist
20 compound is sufficient to cause *CYP1A* induction in fish organs and fins, which
21 could be important information planning fish bioassays and biomonitoring studies.
22 The results give support for the use of the widespread *J. multidentata* guppy as
23 model organism for future toxicological studies in aquatic environments in South
24 America. The study also establishes the use of MS-222 anesthetic procedure for fish
25 use and *in vitro* assays with biopsied fins as an alternative non-lethal method in
26 future experiments assessing *CYP1A* biomarker in fishes.

27

28

29 **Keywords:** *CYP1A*; Fish; *Jenynsia multidentata*; PAH; tricaine; pollution

30

31

1 **1. Introduction**

2 Aquatic ecosystems are significantly impacted by organic contaminants such
3 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), polychlorinated biphenyls (PCBs) and
4 dioxins (i.e. TCDD) that are potential carcinogenic, teratogenic and mutagenic
5 compounds (Aas et al., 2001). The induction of cytochrome P450 1A (CYP1A)
6 biomarker in fish has been extensively used in monitoring and ecotoxicological
7 studies (Whyte et al., 2000) and often measured using enzymatic assays (i.e.
8 ethoxyresorufin-O-deethylase; EROD), western blot protein detection (Bucheli and
9 Fent 1995) and immunohistochemistry (VanVeld et al. 1997). The CYP1A induction
10 occurs via aryl hydrocarbon receptor (AHR) activation in vertebrates such mammals,
11 birds and fishes (Hahn, 2002). Recently, the analysis of *CYP1A* mRNA levels in fish
12 using reverse transcription followed by real time PCR (RT-qPCR) have been
13 evaluated and suggested as a promising tool for biomarker analysis (Pina et al. 2007).

14 The *CYP1A* mRNA transcript level is primarily abundant in liver, but could
15 be also measured in extra-hepatic organs where it is also strongly induced by organic
16 contaminants such PAHs, PCBs and dioxin (Zanette et al., 2009; Jonsson et al.,
17 2007). In addition, fish fins could be targets for *CYP1A* promoter activation by
18 organic chemical exposure, as demonstrated using GFP transgenic fish models (Ng
19 and Gong, 2013; Kim et al., 2013) and histological immunolocalization (Zodrow et
20 al., 2004). The possible advantages using *CYP1A* biomarker evaluation in fish fins
21 remains poorly explored. The *CYP1A* peak of induction by contaminants occurs in a
22 time-dependent manner in different organs of fish (Kim et al., 2008), thus it is
23 important to understand this pattern in order to choose target organs and optimal
24 exposure times to use in ecotoxicological studies and to understand toxicokinetics of
25 compounds as well.

1 The biomarker analysis in classic organs used in aquatic toxicology, such as
2 gills and liver, requires the destructive sampling (lethal), which could possibly
3 endanger fish populations (Ress et al., 2005). In order to minimize this effect,
4 nonlethal sampling methods, including removal of tissue without a major aggression
5 to animals could be an alternative in different animal species (Schmitt and
6 Brumbaugh, 2007). It could be expected that CYP1A activation in external epithelial
7 organs could respond rapidly to waterborne exposure, comparing to hepatic, as it has
8 been suggested using gill filament-based EROD assay (Jonsson et al., 2002), and
9 similarly it could be proposed the use of fins for analysis in order to develop non-
10 lethal biopsy methods.

11 The tricaine methanesulfonate (MS-222) use as a chemical anesthetic
12 emerged around 1967 and has been widely used in fish experimentation in both
13 freshwater and saltwater environment (see Popovic et al. 2012 for a review). Reports
14 on the possible influence of MS-222 in the cytochrome P450 activity are conflicting
15 (Popovic et al., 2012). The evaluation of MS-222 influence on *CYP1A* biomarker
16 response and the influence in other biological responses is required for the ethical use
17 of fish as a monitor species.

18 Cyprinodontiforme fishes that are widespread in aquatic environment, such
19 the North American killifish *Fundulus heteroclitus*, and the South American guppies
20 *Poecilia vivipara* and *Jenynsia multidentata*, are potential species to evaluate the
21 *CYP1A* biomarker (Elskus et al., 1999; Dorrington et al., 2012; Stacke Ferreira et al.,
22 2012, respectively). The guppy *J. multidentata* (Cyprinodontiformes, Anablepidae)
23 occurs from Rio Negro, Argentina to Rio de Janeiro, Brazil, is euryhaline specie and
24 a promising model organism for biomonitoring studies in South America (Stacke
25 Ferreira et al., 2012). The fish has unique characteristics among teleost, such as

1 ovoviviparity and sexual dimorphism with the modification of the male anal fin as a
2 thin and elongated copulatory organ denominated gonopodium that possess
3 regeneration capacity (Turner, 1947; Offen et al., 2008). The study of gonopodium in
4 fishes, and the gene expression evaluation in this organ, has been suggested as
5 important tools for endocrine disruptor evaluation in ecotoxicology (Brockmeier et
6 al., 2013). As far as we know any study has investigated the possible CYP1A
7 induction in gonopodium, and the possibility to develop biopsy non-lethal
8 toxicological assay using this fin.

9 In the present study, the time-dependent and organ-specific *CYP1A* response
10 to beta-naphthoflavone (BNF) exposure was evaluated in *J. multidentata*. The possible
11 influence of MS-222 anesthetic procedure in those responses was also investigated
12 using *in vivo* and *in vitro* (biopsied fin exposure) approaches aiming to give support
13 for the use MS-222 as anesthetic in fish experimentation. The study also contributes
14 with the comprehension of *CYP1A* responses in fins, in order to develop non-lethal
15 biopsy methods. The results presented give support for the use of *J. multidentata* as
16 an alternative model organism for ecotoxicology studies in the South American
17 environment.

18

19 **2. Materials and methods**

20

21 *2.1. Animal collection*

22 Male *J. multidentata* fish (3-5 cm length; 0.5-2.5 g whole body weight; n =
23 150) were collected in a watercourse from an uninhabited area 15 km away from the
24 closest district Balneário Cassino (Rio Grande, RS – Brazil; 32°17'48.36"S e
25 52°16'01.96"O) in August 2013 and November 2013 to be used in the experiments

1 described in the sections 2.2 and 2.3, respectively. Identification of males was
2 verified by observing the gonopodium morphological dimorphism. Acclimation was
3 done for seven days in the laboratory before the beginning of the experiments. The
4 fish were maintained in dechlorinate water, at 24° C, salinity 5, 12 h light / 12 h dark
5 photoperiod, constant aeration and fed twice per day with *Alcon BASIC® MEP 200*
6 *Complex*. The procedures were approved by the Animal Care and Use Committee at
7 the Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

8

9 2.2. Time-dependent *CYP1A* induction to BNF

10 Male fish (n = 84) were divided to make 14 experimental groups with n = 6
11 fish each (1 fish per liter), and maintained in similar conditions as mentioned in the
12 section 2.1. BNF (Sigma-Aldrich, Germany) dissolved in pure DMSO was added in
13 seven experimental groups to make 1 µM BNF and 0.002 % DMSO final
14 concentration in the aquarium. BNF and DMSO concentration were chosen based on
15 previous experiments with zebrafish (Jonsson et al., 2007) and putterfish (Kim et al.,
16 2008). DMSO was also added in seven experimental groups in equivalent volume to
17 make 0.002 % DMSO (control groups). BNF and DMSO were replaced in the
18 exposed and control aquarium, respectively, every 24 hours. Fish from BNF and
19 control groups, were euthanized putting the fish in the ice followed by cervical
20 transection 1-, 2-, 4-, 8-, 24-, 48- and 96- h after the first addition of BNF dissolved
21 in DMSO or DMSO alone. Gill, liver and the anal fin (male gonopodium) were
22 dissected and immediately preserved in RNA later ® (Ambion) according to the
23 manufacturer's instructions.

24 Total RNA was isolated with Trizol reagent (Invitrogen) and reversed
25 transcribed to cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

1 (Applied Biosystems). Specific *CYP1A* and β -*actin* primers pairs (forward 5'-
2 CATGGGCAGTGATGTACCTTGTGG-3' and reverse 5'-
3 GGAGTTCGATCCAGACCAATTTGC-3' for *CYP1A* and forward 5'-
4 AAAGCCAACAGGGAGAAGATGAC-3' and reverse 5'-
5 GCCTGGATGGCAACGTACA-3' for β -*actin*; IDT Integrated DNA Technologies)
6 were designed based on GenBank nucleotide sequences EF362746 and EF362747,
7 respectively. The real-time PCR conditions for those *CYP1A* and β -*actin* primers
8 were tested and established before (Stacke Ferreira et al., 2012).

9 Analysis were performed in duplicate using GoTaq qPCR Master Mix kit
10 (Promega) and a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using the
11 program: 50 °C for 2 min, 95 °C for 2 min and 40 cycles 95 °C for 15s and 60 °C for
12 30s. The $E^{-\Delta Ct}$ method was used to calculate the relative transcriptional level in the
13 experimental groups according to Schmittgen and Livak (2008) using β -*actin* as a
14 reference gene. The threshold used for Ct inference was fixed as 0.2 ΔRn
15 (fluorescence normalized by internal ROX dye) for all runs. Since no differences in
16 the transcriptional levels were observed between control groups from different
17 experimental times all values from control groups were pooled (n = 42) and the mean
18 value was used as a calibrator to evaluate the *CYP1A* induction to BNF in different
19 exposure times. The *CYP1A* fold induction to BNF was represented as the ratio
20 between BNF exposed compared to control. The data from all groups were
21 logarithmically transformed in order to attend the ANOVA assumptions of normality
22 and homoscedasticity and differences between groups were determined by one-way
23 ANOVA followed by Tukey-HSD post hoc test for unequal number samples
24 (p<0.05).

25

1 2.3. MS-222 effects in *J. multidentata* *CYP1A* responses

2 Male fish (n = 24) were transferred to four 6 L aquariums (n = 6 per
3 aquarium) and maintained in similar conditions as mentioned in the section 2.1, but
4 without giving food. BNF dissolved in pure DMSO was added in two aquariums to
5 make 1 μ M BNF concentration and 0.002 % DMSO in the aquariums (BNF exposed
6 groups). DMSO was also added in the other two aquariums in equivalent volume to
7 make 0.002 % DMSO (control groups). BNF exposed and control groups were
8 maintained in those conditions during four hours. Euthanasia was performed in the
9 fish from one of the BNF exposed group aquariums, and one control group aquarium,
10 by submerging the fish on ice during one minute followed by cervical transection. In
11 order to evaluate the effect of MS-222 in the biomarker responses, the same
12 procedure was performed with the other one of the BNF exposed and control groups
13 that stayed for four hours in the experimental conditions, but euthanasia was
14 preceded by anesthesia using MS-222. The MS-222 anesthetic procedure was done
15 according to Popovic et al. (2012) by putting the fish in a non-lethal 100 mg.mL⁻¹
16 MS-222 solution during ~ 2.5 minutes. The anesthetic effect was checked by
17 visualizing the loss of swimming activity and equilibrium.

18 The gonopodium, tail fin, dorsal fin, gill and liver were dissected from the
19 four experimental groups immediately after the euthanasia procedure. Organ
20 preservation in RNA later[®], total RNA extraction, cDNA synthesis, and qPCR was
21 performed as described in the item 2.2. Data were logarithmically transformed in
22 order to attend the ANOVA assumptions of normality and homoscedasticity.
23 Statistical differences in transcriptional levels was carried out using one-way
24 ANOVA followed by the Tukey's post hoc test (p<0.05) in order to compare the
25 *CYP1A* transcriptional levels in the four experimental groups.

1

2 2.4. *CYP1A* responses using non-lethal *in vitro* assay with biopsied fins

3 For the *in vitro* experiment, six beakers were previously kept with 100 mL of
4 0.002 % DMSO, dissolved in dechlorinated water, as control groups, and six beakers
5 were kept with 100 mL of 1 μ M BNF dissolved in DMSO (making 0.002 % DMSO
6 in the final volume of the beaker) as BNF exposed groups, before the fish's fins
7 dissection.

8 Male fish (n = 20) were euthanized by direct submersion in ice during one
9 minute followed by cervical transaction. The gonopodium, dorsal and tail fins were
10 dissected ($\sim 4 \text{ mm}^2$) with vannas scissor. Dorsal fins were immediately placed into
11 two beakers (n=10 in each beaker), that were previously kept as control and BNF
12 exposed, respectively. The same procedure of fin *in vitro* exposure was made for tail
13 and anal fins, totalizing six experimental groups that did not receive anesthesia (three
14 control and three BNF exposed groups).

15 In order to test the possible effect of MS-222 anesthesia in the use of the fin
16 *in vitro* experiment, male fish (n=20) were anesthetized with MS-222, and
17 euthanized by submerging the fish on ice during one minute followed by cervical
18 transection , as previously described in the section 2.3, and the dorsal, tail and anal
19 (gonopodium) fins were dissected ($\sim 4 \text{ mm}^2$ tissue). Dorsal fins were immediately
20 placed into two beakers (n=10 in each), that was previously reserved as control
21 (DMSO) and BNF exposed, respectively. The same procedure was made for tail and
22 anal fins, totalizing six experimental groups with fins of fish that were anesthetized
23 before the dissection (three control and three BNF exposed).

24 All the 120 fins used in the *in vitro* experiment were collected after 4 h in
25 DMSO or BNF. Organ preservation in RNA later ®, total RNA extraction, cDNA

1 synthesis, and qPCR was performed as described in the item 2.2. Data were
2 logarithmically transformed in order to attend the ANOVA assumptions of normality
3 and homoscedasticity. Statistical differences in transcriptional levels was carried out
4 using one-way ANOVA followed by the Tukey's post hoc test ($p < 0.05$) in order to
5 compare the *CYP1A* transcriptional levels in the four experimental groups.

6

7 **3. Results**

8 *3.1. Time-dependent CYP1A induction in response to BNF*

9 The waterborne exposure to 1 μ M BNF caused the induction of *CYP1A* in all
10 analyzed *J. multidentata* organs (gonopodium, gill and liver) and all exposure time
11 tested (from 1 to 96 h) comparing with control (DMSO vehicle; $p < 0.05$). The earliest
12 exposure time tested of 1 h was sufficient to induce *CYP1A* in all tested organ: gill,
13 liver and gonopodium (~ 4-, ~ 3- and ~ 6- fold control, respectively; $p < 0.05$) (Fig. 1).

14 The *CYP1A* induction in gonopodium of fish exposed to BNF reached a peak
15 at 4 h (~ 34- fold control; $p < 0.05$) and decrease after 8 h of exposure, comparing to
16 other BNF exposure time groups ($p < 0.05$). The *CYP1A* level in liver of fish exposed
17 to BNF showed moderate induction in the earliest experimental times of 1, 2 and 4 h,
18 comparing to control (~ 3- to ~ 7- fold control), but was most strongly induced in the
19 later times of exposure tested, between 8 and 96 h (from ~ 30- to ~ 50- fold control;
20 respectively, $p < 0.05$; Fig. 1). The *CYP1A* level in gill of fish exposed to BNF did not
21 elicit a clear peak of induction comparing the different BNF exposure times among
22 then, although the high fold-induction was observed at 48 h (20-fold control).

23

24 *3.2. MS-222 effects in J. multidentata CYP1A responses*

1 The anesthetic procedure with MS-222 did not produce changes in the
2 *CYP1A* transcriptional level, in both the basal levels and in the capacity of the gene
3 to be induced by BNF, in all organs analyzed (anal fin, dorsal fin, tail fin, gill and
4 liver) ($p>0.05$; Fig. 2). Fish that was not anesthetized showed *CYP1A* induction in all
5 organs analyzed after the 4 h waterborne exposure to 1 μM BNF, comparing to
6 control ($p<0.05$; Fig. 2). All tested organs and fins from fish that were MS-222
7 anesthetized showed significant *CYP1A* induction to 4-h exposure to 1 μM BNF,
8 comparing to control, excepting the dorsal fin.

9

10 3.3. *CYP1A* responses using non-lethal *in vitro* assay with biopsied fins

11 Excepting in the biopsied dorsal fins from fish that were not anesthetized
12 with MS-222, 4-h exposure to 1 μM BNF caused induction in the *CYP1A*
13 transcriptional levels in all organs analyzed (anal fin, dorsal fin and tail fin)
14 comparing to the control groups ($p<0.05$; Fig. 3). The MS-222 did not produce
15 changes in the *CYP1A* transcriptional level, in both the basal levels and in the
16 capacity of the gene to be induced to 1 μM BNF, in all organs analyzed ($p<0.05$; Fig.
17 3). The organ with the highest relative induction was the gonopodium (~ 69- fold; p
18 < 0.001 ; Fig. 3) followed by the tail fin (~ 49- fold; $p < 0.05$; Fig.3).

19

20 **4. Discussion**

21

22 4.1. Time-dependent *CYP1A* induction in response to BNF

23 The *CYP1A* enzyme has a central role in the biotransformation of toxic
24 substance and its induction in fish is used since the 1970s to investigate organic
25 contamination and risk assessment in the aquatic environment (Payne, 1976). The

1 *CYP1A* possess a rapid response in the mRNA transcriptional level after waterborne
2 exposure to PAH (few hours) that precede the increasing in the protein CYP1A
3 levels (Kloeppe-Sams and Stegeman, 1989; Levine and Oris, 1999; Kim et al.,
4 2008). The CYP1A response to chemical exposure has been investigated in several
5 fish species (see Sarasquete and Segner, 2000 for a review) and there are reports of
6 *CYP1A* induction to 24-h waterborne exposure to 1 μ M BNF in the liver of pufferfish
7 *Takifugu obscurus* (~ 11- fold control), guppy *Poecilia vivipara* (~ 22- fold) and
8 guppy *Jenynsia multidentata* (~ 185 - fold) (Kim et al., 2008; Stacke Ferreira et al.,
9 2012). Similarly, the present study found high values of fold induction in gill, liver
10 and anal fin (~ 20 -, 50 - and 34 - fold, respectively) after 24-h BNF exposure,
11 supporting the use of the South American *J. multidentata* as monitor specie for AHR
12 agonist contaminants in the aquatic environment. In addition, all the exposure times
13 tested from 1 h to 96 h, elicited this *CYP1A* induction in those *J. multidentata* organs.

14 The *J. multidentata* *CYP1A* induction was noticed after 1-h BNF waterborne
15 exposure, by ~ 4-fold in gill, 3-fold in liver and 6-fold in the gonopodium, comparing
16 to control ($p < 0.05$). This is possibly the first study showing that *CYP1A* response
17 using RT-qPCR in fish hepatic and extra-hepatic organs could occurs after merely 1-
18 h exposure, and this information could be useful to develop practical and rapid
19 assays for environmental risk assessment using *J. multidentata*. Contrasting to our
20 study, the shortest exposure time of 6-h BNF waterborne exposure tested by Kim et
21 al. (2008) was not sufficient to induce *CYP1A* in hepatic and most of the extra-
22 hepatic pufferfish organs (excepting gill and brain). Chung-Davidson et al. (2004)
23 also found that trout *CYP1A* responses did not occurs in the first 2-h in the brain after
24 BNF injection. However, Kloeppe-Sams and Stegeman (1989) found that the shortest
25 time tested of 6 h after BNF injection, is enough time to induce *CYP1A* mRNA levels

1 in the killifish *Fundulus heteroclitus* liver, agreeing with the rapid response found in
2 *J. multidentata* organs. The differences found in those studies could be associated
3 with the phenotypical (i.e. body size) and phylogenetic distances among those fishes.
4 It is important to note that environmental model fish *F. heteroclitus* is equivalent in
5 size and from the same order than *J. multidentata* (Cyprinodontiformes), that could
6 help to explain the similar patterns of responses in those two fishes. The pufferfish
7 (Tetraodontiformes) and trout (Salmoniformes) are separated about 195 and 290
8 million years ago from Cyprinodontiformes, respectively (Steinke et al., 2006). It is
9 also possible that those differences in the time-dependent *CYP1A* induction patterns
10 could be related to distinct biotransformation capacities in different fishes and
11 organs, for example by differences in biotransformation enzymes such the activity of
12 ABC (ATP-binding cassette) efflux transporters (Dean and Annilo, 2005).

13 The *CYP1A* induction in gonopodium of fish exposed to BNF reached a peak
14 at 4 h, preceding the peak between 8 h-96 h that was observed in liver, while gills did
15 not elicited a clear peak of induction, comparing different exposure times.
16 Gonopodium is a copulatory organ formed from a lengthening of the anterior anal fin
17 (Ogino et al., 2004) and this is possibly the first study showing that *CYP1A* is
18 strongly induced by AHR agonists, in this fish organ. The primary fin contact with
19 the water, comparing to liver, could be the explanation why the peak of induction
20 was first observed in gonopodium. The anal fin constitution supports its capability
21 for *CYP1A* induction, since it is rich in epithelial cells (Ogino et al., 2004) and
22 immunohistochemical analysis shows a very strong positive CYP1A staining in
23 endothelial and epithelial cells of tilapia fish exposed to contaminants (Bainy et al.,
24 1999). The use of gonopodium has great perspectives to develop non-lethal organ
25 biopsy procedure for the study of organisms in contaminated areas because it is an

1 organ with confirmed capacity for regeneration thus its use could be proposed to be
2 used in toxicological assays (Turner, 1947; Offen et al., 2008).

3 The *CYP1A* response to BNF did not fall after reach the maximum induction
4 in gill and liver, and remained at the highest levels until 96-h exposure. Kim et al.
5 (2008) found different results, with a fall in the *CYP1A* induction from 24-h to 96-h
6 BNF exposure. It is possible that the differences observed by Kim et al. (2008) are
7 related to BNF biotransformation, elimination or decay in water. In our study the
8 water containing BNF was renewed every 24 h, which could be an important factor
9 for the maintenance of *CYP1A* induction, and BNF concentrations in water,
10 contributing to the differences between those studies. Different from gill and liver,
11 gonopodium did not retained the same *CYP1A* induction after the peak at 4-h BNF
12 exposure. It was possible to confirm that even at 96 h the *CYP1A* response system
13 was maintained active in gill and liver, which is important for biomonitoring studies
14 since the response remains active if the compound is present in the water.

15

16 4.2. MS-222 effects in *J.multidentata* *CYP1A* responses

17 The fish immersion for 2.5 minutes in 100 mg.mL⁻¹ tricaine MS-222 did not
18 altered the *CYP1A* basal level and the transcriptional induction after 4-h BNF
19 exposure, comparing to control. The absence of MS-222 anesthetic influence was
20 similar in the *in vivo* and biopsied organ *in vitro* BNF exposures. This is in
21 agreement with a study with Rainbow Trout showing that cytochrome P450 content
22 and activity in responses to injection with the AHR agonist BNF (100 mg.Kg⁻¹) was
23 not altered by a previous tricaine immersion in 50 mg.L⁻¹ (Kleinow et al., 1986).
24 Thus, it could be concluded that tricaine does not influence significantly the *CYP1A*
25 in the protein and transcriptional levels as well.

1 The strong *CYP1A* inductions by 4-h BNF exposure that was observed in
2 liver, gill and fins (anal, dorsal and caudal) are consistent with the literature,
3 particularly considering the liver (Elskuss et al., 1999; Wang et al., 2010; Stacke
4 Ferreira et al., 2012). Gill is also an important target organ for water pollution studies
5 and MS-222 absorption and elimination occurs by diffusion through the gill
6 membranes (Wayson et al., 1976). Studies have reported that this anesthetic causes
7 impacts on circulatory changes in the secondary lamellae as vasodilatation (Soivio
8 and Hughes, 1978), but apparently this effect does not influence the levels of *CYP1A*
9 transcription. We did not find studies in the literature involving the effect of
10 anesthetics on expression of *CYP1A* in fins, and probably this is the first study to
11 shows the absence of MS-222 effect in this organ. Therefore, we showed that MS-
12 222 could be used in *J. multidentata* for anesthetic procedures, and does not interfere
13 in the responses of this biomarker.

14

15 4.3. *CYP1A* responses using *in vitro* assay with biopsied fins

16 The use of biopsied organs could serve as alternative non-lethal procedures to
17 environmental risks assessment. Among the analyzed organs, the tail fin and
18 gonopodium showed the highest levels for *CYP1A* induction after 4-h *in vitro*
19 exposure to the AHR agonist BNF (~ 69- and ~ 49- fold, respectively). Although the
20 gonopodium is a modified fin its histological composition is different from the other
21 fins analyzed because epithelial cells are abundant (Kuntz, 1914; Zauner et al., 2003;
22 Ogino et al., 2004), while the other fins (tail and dorsal) show a dermal skeleton
23 (similar to that found in scales). Additionally, as the tail fin also presented high
24 levels of *CYP1A* induction, it brings prospects for the use of this organ in
25 toxicological tests without the need to cause death or injury to the animal. In the

1 zebrafish, the tail fin regeneration occurs within 4 days after amputation (Geraudie et
2 al., 1995; Poleo et al., 2001). The ability to regenerate the dermal skeleton in model
3 fishes is getting attention by the study of molecular mechanisms underlying growth
4 and regeneration (Zauner et al., 2003). Probably, regeneration in *Jenynsia*
5 *multidentata* is similar to other fishes, providing positive perspectives for the use of
6 non-lethal methods for biomonitoring using this specie. Studies could be conducted
7 to determine the total regeneration time and the influence of contaminants in the
8 regeneration in *J. multidentata*.

9 The response of the biopsied fin assay with dorsal fin was not successful,
10 since *CYP1A* was not induced in the non-anesthetized fish and weakly induced by
11 BNF in the MS-222 anesthetized fish. Those unexpected results with dorsal fin could
12 be related to the difficulty to dissect the organ, small size and the different tissue
13 constitution comparing to the other analysed fins. In a study with the rainbow trout
14 *Oncorhynchus mykiss*, the dorsal adipose fin shows only a moderate induction of
15 *CYP1A* after exposure to benzo[a]pyrene (Brzuzan et al., 2007). It is also possible
16 that the MS-222 causes the down-regulation in the *CYP1A* basal levels, idea that is
17 supported by the difference found in respect to all the other three experimental
18 groups. In fact, the idea that MS-222 could cause a moderate decrease in CYP1A,
19 denoted by EROD activity, was reported before (Kleinow et al., 1986).

20 Both *in vitro* and *in vivo* assays were used to assess environmental exposure
21 to PAHs through the evaluation of *CYP1A* (Willett et al., 1997; Fent and Batscher,
22 2000; Whyte et al., 2000). *In vitro* studies generally use cell lines and not the tissue
23 from biopsies and non-lethal studies. The use of the biopsied fin method presents
24 short term response and easy handling that can facilitate the biomarker evaluation in
25 the laboratory and field.

1

2 **5. Conclusion**

3 The time-dependent *CYP1A* induction to BNF exposure was evaluated in
4 different organs of the guppy *Jenynsia multidentata*. This is possibly the first study
5 showing that 1-h waterborne exposure to an AHR agonist compound can be
6 sufficient time to cause *CYP1A* induction in liver, gill and fin of fish. The use of the
7 anesthetic tricaine MS-222 did not influence *CYP1A* responses in fish, which is
8 important information considering the growing necessity of anesthetic procedures for
9 the ethical use of fish in toxicology. Short exposure time are sufficient to cause
10 *CYP1A* induction in biopsied tail fin and gonopodium analysis using an *in vivo* BNF
11 exposure, or an *in vitro* BNF exposure of biopsied fins, represent a promising
12 application in ecotoxicology by developing non-lethal procedures using fish. The
13 present study provides important information for the use of the South American
14 guppy *J. multidentata* for toxicological studies.

15

16 **Acknowledgements**

17 Financial support is acknowledged to Conselho Nacional de Desenvolvimento
18 Científico e Tecnológico CNPq 480708/2013-4 (Brazil), CNPq 573949/2008-5
19 (Brazil), IFS A/5350-1 (Stockholm, Sweden), Fundação de Amparo à Pesquisa do
20 Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS ARD 03/2012 12/1328-5), PROAP-
21 CAPES, DP was supported by CAPES-REUNI fellowship, Brazil. Authors would
22 like to thanks for the technical assistance with experiments and laboratory analysis
23 provided by Cássia R. Silveira, Loraine Moraes and Josencler Ferreira.

24

25 **6. References**

- 1 Aas, E., Beyer, J., Jonsson, G., Reichert, W.L. and Andersen, O.K., 2001. Evidence
2 of uptake, biotransformation and DNA binding of polycyclic aromatic hydrocarbons
3 in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium
4 works. *Mar. Environ. Res.* 52, 213-229.
- 5 Bainy, A.C.D., Woodin, B.R. and Stegeman, J.J., 1999. Elevated levels of multiple
6 cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir-Sao Paulo, Brazil.
7 *Aquat. Toxicol.* 44, 289-305.
- 8 Bucheli, T.D. and Fent, K., 1995. Induction of Cytochrome-P450 as a Biomarker for
9 Environmental Contamination in Aquatic Ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci.*
10 *Technol.* 25, 201-268.
- 11 Brockmeier, E.K., Ogino, Y., Iguchi, T., Barber, D.S. and Denslow, N.D., 2013.
12 Effects of 17 beta-trenbolone on Eastern and Western mosquitofish (*Gambusia*
13 *holbrooki* and *G-affinis*) anal fin growth and gene expression patterns. *Aquat.*
14 *Toxicol.* 128, 163-170.
- 15 Brzuzan, P., Woeny, M., Luczyfski, M.K. and Góra, M., 2007. CYP1A gene
16 expression in adipose fin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)
17 exposed to benzo[a]pyrene. *Environ. Biotechnol.* 3, 20-24.
- 18 Chung-Davidson, Y.W., Rees, C.B., Wu, H., Yun, S.S. and Li, W.M., 2004. beta-
19 naphthoflavone induction of CYP1A in brain of juvenile lake trout (*Salvelinus*
20 *namaycush* Walbaum). *J. Exp. Biol.* 207, 1533-1542.
- 21 Dean, M. and Annilo, T., 2005. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC)
22 transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6,
23 123-142.
- 24 Dorrington, T., Zanette, J., Zacchi, F.L., Stegeman, J.J. and Bainy, A.C.D., 2012.
25 Basal and 3-methylcholanthrene-induced expression of cytochrome P450 1A,

1 1B and 1C genes in the Brazilian guppy, *Poecilia vivipara*. *Aquat. Toxicol.*
2 124-125C, 106-113.

3 Elskus, A. A., Monosson, E., McElroy, A.E., Stegeman, J.J. and Woltering, D.S.,
4 1999. Altered CYP1A expression in *Fundulus heteroclitus* adults and larvae: a
5 sign of pollutant resistance? *Aquat. Toxicol.* 45, 99-113.

6 Fent, K. and Batscher, R., 2000. Cytochrome P4501A induction potencies of
7 polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: demonstration of
8 additive interactions. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2047–2058.

9 Geraudie, J., Monnot, M. J., Brulfert, A. and Ferretti, P., 1995. Caudal fin
10 regeneration in wild type and long-fin mutant zebrafish is affected by retinoic
11 acid. *Int. J. Dev. Biol.* 39, 373–381.

12 Hahn, M.E., 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem.-Biol.*
13 *Interact.* 141, 131-160.

14 Jonsson, M.E., Orrego, R., Woodin, B.R., Goldstone, J.V. and Stegeman, J.J., 2007.
15 Basal and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced expression of cytochrome
16 P450 1A, 1B and 1C genes in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221, 29-41.

17 Jonsson, E.M., Brandt, I. and Brunstrom, B., 2002. Gill filament-based EROD assay
18 for monitoring waterborne dioxin-like pollutants in fish. *Environ. Sci. Technol.*
19 36, 3340-3344.

20 Kim, K.H., Park, H.J., Kim, J.H., Kim, S., Williams, D.R., Kim, M.K., Jung, Y.D.,
21 Teraoka, H., Park, H.C., Choy, H.E., Shin, B.A. and Choi, S.Y., 2013. *Cyp1a*
22 reporter zebrafish reveals target tissues for dioxin. *Aquat. Toxicol.* 134, 57-65.

23 Kim, J.H., Raisuddin, S., Ki, J.S., Lee, J.S. and Han, K.N., 2008. Molecular cloning
24 and beta-naphthoflavone-induced expression of a cytochrome P450 1A

- 1 (CYP1A) gene from an anadromous river pufferfish, *Takifugu obscurus*. Mar.
2 Pollut. Bull. 57, 433-440.
- 3 Kleinow, K.M., Haasch, M.L. and Lech, J.J., 1986. The Effect of Tricaine
4 Anesthesia Upon Induction of Select P-450 Dependent Monooxygenase
5 Activities in Rainbow-Trout (*Salmo gairdneri*). Aquat. Toxicol. 8, 231-241.
- 6 Kloppersams, P.J. and Stegeman, J.J., 1989. The Temporal Relationships between
7 P450e-Protein Content, Catalytic Activity, and Messenger-Rna Levels in the
8 Teleost *Fundulus heteroclitus* Following Treatment with Beta-Naphthoflavone.
9 Arch. Biochem. Biophys. 268, 525-535.
- 10 Kuntz, A., 1914. Notes on the habits, morphology of the reproductive organs, and
11 embryology of the viviparous fish *Gambusia affinis*. Bull. US Bur. Fish. 33,
12 177-190.
- 13 Levine, S.L. and Oris, J.T., 1999. CYP1A expression in liver and gill of rainbow
14 trout following waterborne exposure: implications for biomarker
15 determination. Aquat. Toxicol. 46, 279-287.
- 16 Ng, G.H. and Gong, Z., 2013. GFP transgenic medaka (*Oryzias latipes*) under the
17 inducible *cyp1a* promoter provide a sensitive and convenient biological
18 indicator for the presence of TCDD and other persistent organic chemicals.
19 PLoS One 8, e64334.
- 20 Offen, N., Blum, N., Meyer, A. and Begemann, G., 2008. Fgfr1 signalling in the
21 development of a sexually selected trait in vertebrates, the sword of swordtail
22 fish. BMC Dev. Biol. 8, 98.
- 23 Ogino, Y., Katoh, H. and Yamada, G., 2004. Androgen dependent development of a
24 modified anal fin, gonopodium, as a model to understand the mechanism of
25 secondary sexual character expression in vertebrates. FEBS Lett 575, 119-126.

- 1 Payne, J.F., 1976. Field Evaluation of Benzopyrene Hydroxylase Induction as a
2 Monitor for Marine Petroleum Pollution. *Science* 191, 945-946.
- 3 Pina, B., Casado, M. and Quiros, L. 2007. Analysis of gene expression as a new tool
4 in ecotoxicology and environmental monitoring. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26,
5 1145-1154.
- 6 Poleo, G., Brown, C.W., Laforest, L. and Akimenko, M.A., 2001. Cell proliferation
7 and movement during early fin regeneration in zebrafish. *Dev. Dynamics* 221,
8 380-390.
- 9 Popovic, N.T., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Barisic, J., Jadan, M.,
10 Berakovic, A.P. and Klobucar, R.S., 2012. Tricaine methane-sulfonate (MS-
11 222) application in fish anaesthesia. *J. Appl. Ichthyol.* 28, 553-564.
- 12 Ress, C.B., McCormick, S.D. and Li, W. 2005., A non-lethal method to estimate
13 CYP1A expression in laboratory and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp.*
14 *Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 141, 217-224.
- 15 Sarasquete, C. and Segner, H., 2000. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean
16 fishes. A review of immunohistochemical studies. *Sci. Tot. Environ.* 247, 313-
17 332.
- 18 Schmitt, C.J. and Brumbaugh, W.G., 2007. Evaluation of potentially nonlethal
19 sampling methods for monitoring mercury concentrations in smallmouth bass
20 (*Micropterus dolomieu*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 84-95.
- 21 Soivio, A. and Hughes, G.M., 1978. Circulatory Changes in Secondary Lamellae of
22 *Salmo gairdneri* Gills in Hypoxia and Anesthesia. *Annales Zoologici Fennici*
23 15, 221-225.
- 24 Stacke Ferreira, R., Monserrat, J.M., Ribas Ferreira, J.L., Kalb, A.C., Stegeman, J.,
25 Dias Bairy, A.C. and Zanette, J., 2012. Biomarkers of organic contamination

- 1 in the South American fish *Poecilia vivipara* and *Jenynsia multidentata*. J.
2 Toxicol. Environ. Health 75, 1023-1034.
- 3 Steinke, D., Salzburger, W. and Meyer, A., 2006. Novel relationships among ten fish
4 model species revealed based on a phylogenomic analysis using ESTs. J. Mol.
5 Evol. 62, 772-784.
- 6 Turner, C.L., 1947. The Rate of Morphogenesis and Regeneration of the
7 Gonopodium in Normal and Castrated Males of *Gambusia affinis*. J. Exp. Zool.
8 106, 125-143.
- 9 VanVeld, P.A., Vogelbein, W.K., Cochran, M.K., Goksoyr, A. and Stegeman, J.J.,
10 1997. Route-specific cellular expression of cytochrome P4501A (CYP1A) in
11 fish (*Fundulus heteroclitus*) following exposure to aqueous and dietary
12 benzo[a]pyrene. Toxicol. Appl. Pharmacol. 142, 348-359.
- 13 Wang, L., Camus, A.C., Dong, W., Thornton, C. and Willett, K.L., 2010. Expression
14 of CYP1C1 and CYP1A in *Fundulus heteroclitus* during PAH-induced
15 carcinogenesis. Aquat. Toxicol. 99, 439-447.
- 16 Wayson, K. A., Downes, H., Lynn, R.K. and Gerber, N., 1976. Studies on the
17 comparative pharmacology and selective toxicity of tricaine methanesulfonate:
18 metabolism as a basis of the selective toxicity in poikilotherms. J. Pharmacol.
19 Exp. Ther. 198, 695-708.
- 20 Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J. and Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-O-
21 deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. Crit.
22 Rev. Toxicol. 30, 347-570.
- 23 Willett, K.L., Gardinali, P.R., Sericano, J.L., Wade, T.L. and Safe, S.H., 1997.,
24 Characterization of the H4IIE rat hepatoma cell bioassay for evaluation of

1 environmental samples containing polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs).
2 Arch. Environ. Toxicol. 32, 442–448.

3 Zanette, J., Jenny, M.J., Goldstone, J.V., Woodin, B.R., Watka, L.A., Bainy, A.C.D.
4 and Stegeman, J.J., 2009. New cytochrome P450 1B1, 1C2 and 1D1 genes in
5 the killifish *Fundulus heteroclitus*: Basal expression and response of five
6 killifish CYP1s to the AHR agonist PCB126. Aquat. Toxicol. 93, 234-243.

7 Zauner, H., Begemann, G., Mari-Beffa, M. and Meyer, A., 2003. Differential
8 regulation of msx genes in the development of the gonopodium, an intromittent
9 organ, and of the "sword," a sexually selected trait of swordtail fishes
10 (Xiphophorus). Evol. Dev. 5, 466-477.

11 Zodrow, J.M., Stegeman, J.J. and Tanguay, R.L., 2004. Histological analysis of acute
12 toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. Aquat.
13 Toxicol. 66, 25-38.

14
15
16
17
18
19
20

21 **Figure captions**

22 **Fig. 1.** *CYP1A* transcription levels in gill, liver and gonopodium of *Jenynsia*
23 *multidentata* after 1-, 2-, 4-, 8-, 24-, 48- and 96- h exposure to 1 μ M beta-
24 naphthoflavone (BNF; n = 6) or DMSO vehicle alone (Control; n = 42). *CYP1A* fold
25 induction to BNF relative to Control is denoted by numbers above the bars. *CYP1A*

1 levels are represented as mean \pm stdev calculated as $E^{-\Delta Ct}$ using β -actin as reference
2 gene. Equal small letters represent absence of difference in a given tissue (one-way
3 ANOVA followed by unequal-N HSD post hoc test; $p < 0.05$).

4

5 **Fig. 2.** *CYP1A* transcription levels in the gonopodium, dorsal fin, tail fin, gill and
6 liver of *Jenynsia multidentata* 4-h exposed to 1 μ M beta-naphthoflavone (BNF) or
7 DMSO vehicle alone. White bars represent fish that were not chemically
8 anesthetized and gray bars represent fish that was anesthetized with 100 mg.mL⁻¹
9 tricaine MS-222 prior to the euthanasia and dissection. *CYP1A* fold induction, in
10 respect to control, is denoted by numbers above the bars. *CYP1A* levels are
11 represented as means \pm stdev calculated as $E^{-\Delta Ct}$ using β -actin as reference gene.
12 Differences between bars were determined by one-way ANOVA followed by Tukey-
13 HSD ($n=6$; $p<0.05$).

14

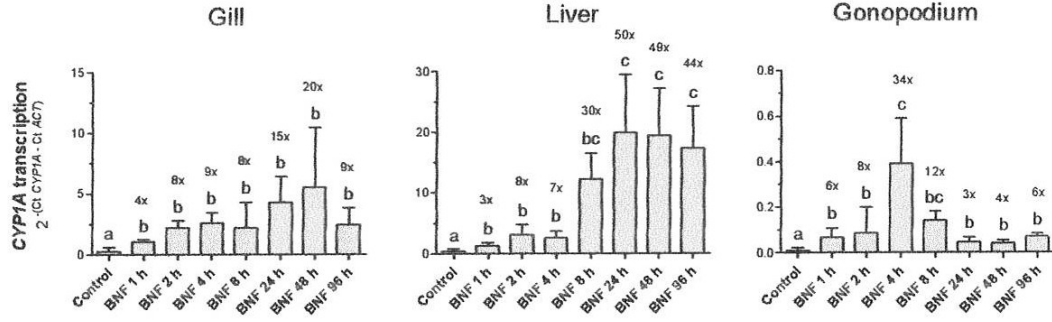
15 **Fig. 3.** *CYP1A* transcription levels in gonopodium, dorsal fin and tail fin that were
16 biopsied from *Jenynsia multidentata* and 4-h exposed *in vitro* to 1 μ M beta-
17 naphthoflavone (BNF) or DMSO vehicle alone. White bars represent fish that were
18 not chemically anesthetized and gray bars represent fish that was anesthetized with
19 100 mg.mL⁻¹ tricaine MS-222 prior to the euthanasia and dissection. *CYP1A* fold
20 induction relative to control is denoted by numbers above the bars. *CYP1A* level is
21 represented as mean \pm stdev calculated as $E^{-\Delta Ct}$ using β -actin as reference gene.
22 Equal small letters represent absence of difference (one-way ANOVA followed by
23 Tukey-HSD; $n=6$; $p < 0.05$).

24

25

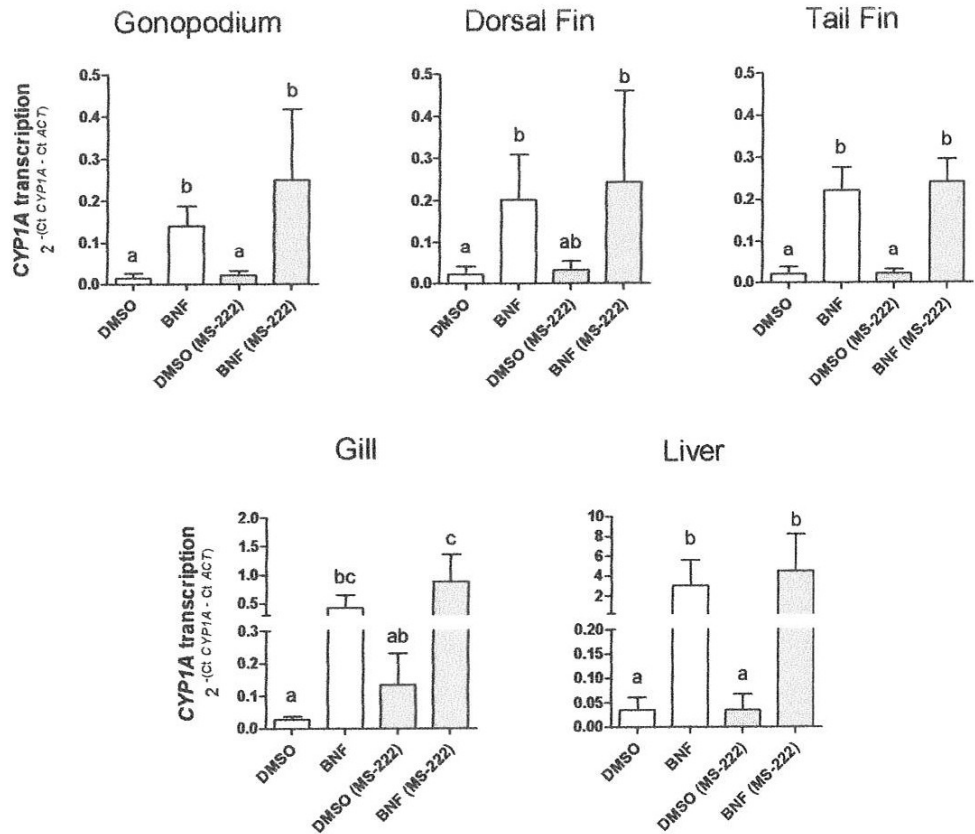
1 Figures

2 Fig 1.



3

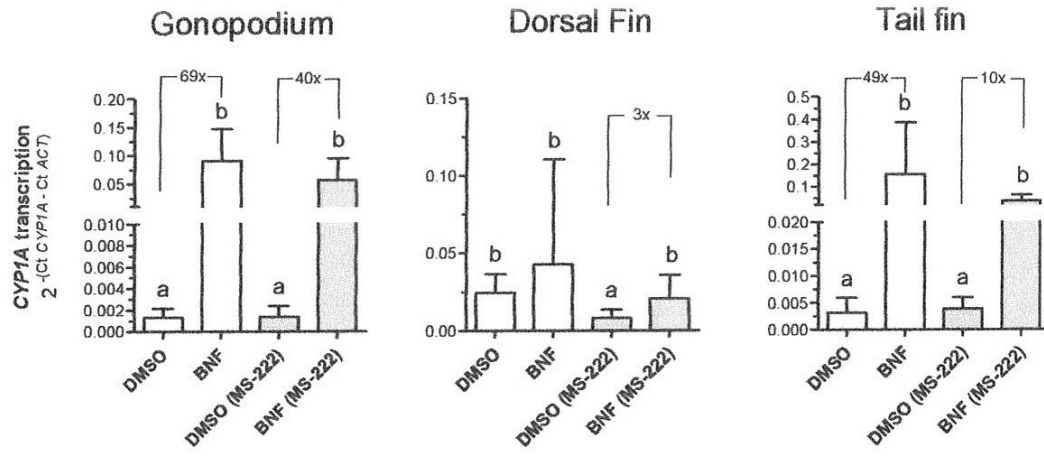
4 Fig 2.



5

6

1 Fig 3.



This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.