

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA
BIOLÓGICA

AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO REFRACTÁRIO DO *CYPIA* EM
GUARÚS PARA ESTUDOS DE ADAPTAÇÃO PARA A
POLUIÇÃO EM PEIXES

ROXANA MARGARITA LÓPEZ MARTÍNEZ

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Oceanografia Biológica da
Universidade Federal do Rio Grande - FURG,
como requisito parcial à obtenção do título de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Juliano Zanette

RIO GRANDE
Fevereiro, 2019

AGRADECIMENTOS

A Deus!

Minha dissertação de mestrado, assim como o estudo da pós-graduação em Oceanografia Biológica, não teria sido possível sem o apoio constante de muitas pessoas, primeiro do que nada, minha família, a quem dedico este trabalho, pelo imenso carinho e apoio dos meus pais em todas as decisões na minha vida, incluindo aquelas que terminam me levando longe de casa e do país, meus irmãos Wilfredo, Omar e Raúl colegas de batalhas e esforços ainda desde longe.

Aos meus professores e colegas do PPGOB, ao professor Gustavo Cardoso pela ajuda desde minha chegada ao programa e principalmente a meu orientador Juliano Zanette, pela oportunidade, paciência, tempo e por todo o conhecimento transmitido ainda estando ciente da minha ausência de experiência em bioquímica e biologia molecular no início da formulação do projeto de mestrado. Ao técnico do Biotério Aquático do ICB, Mateus Tavares, por toda sua ajuda nas coletas, manutenção e treinamento no biotério.

A todos aqueles amigos que desde uma enorme distância sempre estiveram por perto, Alejandro, Doris, Irene, Mauricio, Reynaldo, Mayerlin, Yamili, Dilia, Lizeth, Connie e a incondicional Jenniffer.

A aquelas novas amigas feitas na FURG, no Laboratório e no grupo de pesquisa, que sem dúvida fizeram esse caminho mais tranquilo e agradável, especialmente as “gúrias” Carolina e Tatiana, Mónica, Russell, Gabriel, Muryllo, Samantha, Fernanda, Marcela e Verónica.

Finalmente, Gionara Tauchen, pelo apoio, carinho e sempre buscar soluções as minhas necessidades na FURG. A Organização dos Estados Americanos (OEA) a través da parceria com o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras e seu Programa de Alianças para a Educação e Capacitação (PAEC) por ter-me selecionado para ser bolsista da CAPES e conseguir fazer meus estudos de mestrado.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Características dos poecilídeos: <i>Poecilia vivipara</i> e <i>Phalloceros caudimaculatus</i>	6
1.2 Uso de poecilídeos em estudos ecotoxicológicos	7
1.3 Fenótipo Refratário do Citocromo P450 1A	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Coleta e manutenção de peixes.	10
2.2. Exposição dos peixes ao BNF.....	10
2.3 Avaliação dos níveis de mRNA do <i>CYP1A</i>	11
2.4. Análise estatística.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1 Respostas transcricionais do <i>CYP1A</i> à BNF, comparado com o controle.....	13
3.2. Comparação dos valores de EC50- <i>CYP1A</i>	16
3.3 Comparação da expressão máxima de <i>CYP1A</i> a 10.000 η M BNF.....	18
3.4. Avaliação do fenótipo refratário do <i>CYP1A</i> em guppies	19
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
APÊNDICES	26
APÊNDICE 1, (MANUSCRITO)	26

RESUMO

A incapacidade de induzir o citocromo P4501A (*CYP1A*) por compostos semelhantes às dioxinas é uma característica bem estudada em populações de peixes que habitam em locais altamente contaminados na América do Norte. O objetivo deste estudo foi investigar a existência do fenótipo refratário do *CYP1A* em populações de guarús sul-americanos *Poecilia vivipara* e *Phalloceros caudimaculatus* de dois locais na cidade de Rio Grande (RS, Brasil) com diferentes níveis de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) no sedimento. Os alevinos de primeira geração (F1) foram expostos durante 24 horas às concentrações de 0, 10, 100, 1.000 e 10.000 η M de beta-naftoflavona (BNF), um conhecido indutor do *CYP1A*. A expressão de mRNA do *CYP1A* foi determinada usando PCR em tempo real (RT-qPCR). Primeiramente, foi utilizado o *endpoint* usual para avaliação do fenótipo refratário do *CYP1A*, comparando peixes expostos a BNF com o controle. A concentração de 10 η M evidenciou um fenótipo refratário do *CYP1A* em *P. vivipara* do local poluído (P), mas não foi evidenciado para concentrações mais elevadas de BNF e foi ausente para *P. caudimaculatus*. Então, foram usados dois *endpoints* alternativos para avaliação das capacidades de resposta alteradas do *CYP1A* em populações distintas: 1) a comparação estatística de EC50 e de curvas dose-resposta de BNF usando o pacote DRC do programa R e 2) comparação estatística do nível máximo de *CYP1A* através da exposição a 10.000 η M BNF. Os valores de EC50 para os locais de referência (R) e P indicaram uma capacidade de indução do *CYP1A* alterada para *P. vivipara* (190,8 η M e 15905,7 η M BNF, respectivamente, $p < 0,05$) mas não para *P. caudimaculatus* (220,2 e 265,2 η M BNF, respectivamente $p = 0,47$). O nível do *CYP1A* a 10.000 η M BNF foi maior na população do local R (*P. vivipara* $0,22 \pm 0,06$; *P. caudimaculatus* $0,39 \pm 0,11$) do que no local P (*P. vivipara* $0,02 \pm 0,01$; *P. caudimaculatus* $0,17 \pm 0,03$) para ambos guarús. Este é o primeiro estudo a avaliar sistematicamente o fenótipo refratário do *CYP1A* em guarús. Os resultados indicam que o valor de EC50 comparado estatisticamente e a indução máxima de *CYP1A* a 10.000 η M de BNF são *endpoints* promissores para a identificação do fenótipo refratário de *CYP1A* em peixes.

Palavras-chave: AHR, CYP1A, Fenótipo refratário, PAHs, Poluição aquática.

ABSTRACT

The inability to induce cytochrome P4501A (*CYP1A*) by dioxin-like compounds is a well studied characteristic of fish populations inhabiting highly contaminated sites in North America. The aim of this study was to investigate the existence of the *CYP1A* refractory phenotype in populations of South American guppies *Poecilia vivipara* and *Phalloceros caudimaculatus* from two sites in the Rio Grande city (RS, Brazil) with different levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in sediment. First-generation (F1) fingerling were 24-h waterborne exposed to concentrations of 0, 10, 100, 1,000 and 10,000 η M of beta-naphthoflavone (BNF), a known inducer of *CYP1A*. A mRNA expression of the *CYP1A* was determined using real time PCR (RT-qPCR). Firstly, the usual endpoint for *CYP1A* refractory phenotype evaluation was used, by comparing fish exposed to BNF and control. The concentration of 10 η M evidenced a *CYP1A* refractory phenotype in *P. vivipara* from polluted site (P) but was not evident for higher BNF concentrations and was absent for *P. caudimaculatus*. Then, two alternative endpoints for evaluation of altered *CYP1A* response capacities in distinct populations was used: 1) the statistical comparison of EC50 of BNF dose-response curves using the DRC package of the R program and 2) statistical comparison of maximum *CYP1A* level through exposure to 10,000 η M BNF. The EC50 values for reference (R) and P sites, denoted an altered *CYP1A* induction capacity for *P. vivipara* (190.8 η M and 15905.7 η M BNF, respectively, $p < 0.05$) but not for *P. caudimaculatus* (220.2 and 265.2 η M BNF, respectively, $p = 0.47$). The *CYP1A* level to 10,000 η M BNF was higher in population from R site (*P. vivipara* 0.22 ± 0.06 ; *P. caudimaculatus* 0.39 ± 0.11) than P site (*P. vivipara* 0.02 ± 0.01 ; *P. caudimaculatus* 0.17 ± 0.03) for both guppies. This is the first study to systematically evaluate the *CYP1A* refractory phenotype in guppies. The results point out that EC50 and maximum *CYP1A* induction to 10,000 η M BNF are promise endpoints to identification of *CYP1A* refractory phenotype in fish.

Keywords: AHR, Aquatic pollution, *CYP1A*, PAH, Refractory phenotype.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características dos poecilídeos: *Poecilia vivipara* e *Phalloceros caudimaculatus*

Peixes Cyprinodontiformes são amplamente distribuídos na região Neotropical e usam micro habitats deteriorados em rios onde poucas espécies podem ocorrer (Araujo et al., 2009).

Os Poeciliidae é uma grande família de peixes nativos das Américas do Norte, Central e do Sul e inclui muitas espécies que foram transportadas ao redor do mundo, principalmente pelo comércio de aquários (Rowley et al., 2005)

Esta família apresenta uma notável variedade de adaptação reprodutiva, apenas uma das 150 espécies conhecidas não é vivípara; tem desenvolvido a capacidade de fertilização interna, mudando assim o conjunto de estratégias reprodutivas utilizadas (Thibault & Scheultz, 1978).

Poecilia vivipara (figura 1) pertence a esta família, possuem cabeça e corpo moderadamente robustos, moderadamente comprimidos para trás, cabeça deprimida, narina frontal não tubular, boca pequena ligeiramente oblíqua, maxilar inferior ligeiramente saliente e o superior protrátil. Uma barbatana dorsal com base curta; a barbatana anal nos machos é modificada para formar um órgão sexual alongado que é relativamente curto e com uma ponta reta que tem pequenos espinhos e um tentáculo carnudo. a barbatana caudal é arredondada com base relativamente estreita; coloração cinza-amarelada, com prata na barriga e bochechas, geralmente com uma grande mancha negra na parte superior do corpo, abaixo da barbatana dorsal em ambos os sexos, atinge 7,2 cm e está presente em águas salgadas e doces resistente a variações ambientais, distribuído desde a Venezuela, ao longo da costa Brasileira até a Argentina (Robertson et al., 2015; Froese & Pauly 2018).

Classe	Actinopterygii
Ordem	Cyprinodontiformes
Família	Poeciliidae
Gênero	Poecilia
Espécie	<i>Poecilia vivipara</i>



Figura 1. *Poecilia vivipara*, esquerda fêmea, direita macho.

Phalloceros caudimaculatus (figura 2), possui nadadeira dorsal curta; nadadeira peitoral pequena, não alcançando o nível das bases da nadadeira pélvica; corpo e nadadeiras cobertos com uma profusão de manchas pretas; ponta de gonopodium do macho com um gancho distintamente virado; após 24 dias de gestação nascem de 10 a 50 alevinos. Distribuído em ambientes de água doce e estuarinos do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, sendo também introduzidas em países de outros continentes, como Malawi e Nova Zelândia (Lucinda 2008)

Classe	Actinopterygii
Ordem	Cyprinodontiformes
Família	Poeciliidae
Gênero	Phalloceros
Espécie	<i>Phalloceros caudimaculatus</i>



Figura 2. *Phalloceros caudimaculatus*, esquerda fêmea, direita macho.

1.2 Uso de poecilídeos em estudos ecotoxicológicos

Os poecilídeos têm sido amplamente usados em estudos ecotoxicológicos, particularmente *P. vivipara* tem sido usado como modelo em estudos de testes de toxicidade, avaliação de biomarcadores e monitoramento ambiental (Harayashiki et al., 2013, de Souza Machado et al., 2013, de Souza Machado et al., 2014), alguns desses estudos incluem como biomarcador de avaliação do CYP1A (Mattos et al., 2010).

Recentemente *P. caudimaculatus* ao encontrar-se em ambientes aquáticos contaminados (Araújo et al., 2009), também tem sido uma espécie modelo para estudos de biologia molecular relacionados à ecotoxicologia (Shiogiri et al., 2010), incluindo também estudos com *CYP1A* (Chivittz et al., 2016; Ferreira et al., 2016)

1.3 Fenótipo Refratário do Citocromo P450 1A

Peixes de estuários urbanos e industrializados estão expostos a níveis de contaminação mais altos do que qualquer população de vertebrados (Wirgin & Waldman, 2004). Algumas populações de peixes da América do Norte, como *Fundulus heteroclitus*, *Fundulus grandis* e *Microgadus tomcod*, desenvolveram alterações moleculares que permitem que habitem em locais com altos níveis de hidrocarbonetos aromáticos polihalogenados e policíclicos aromáticos (HPA) (Elskus et al., 1999; Wirgin & Waldman, 2004; Nacci et al., 2010; Wills et al., 2010; Oziolor et al., 2014; Wojdylo et al., 2016; Lindberg et al. al., 2017).

A resistência pode ser causada pela adaptação genética ou aclimatização fisiológica. A distinção entre essas possibilidades é importante para prever a persistência da resistência e os possíveis custos para as populações e comunidades afetadas (Meyer et al., 2002; Ownby et al., 2002; Wirgin & Waldman, 2004). A adaptação é o processo genético pelo qual uma população muda para se acomodar aos fatores ambientais e a aclimatação são as mudanças fisiológicas que um indivíduo faz para minimizar os efeitos dos estressores (Meyer et al., 2002; Ownby et al., 2002).

Em alguns casos, a resistência é transferida para as gerações seguintes (Meyer et al., 2002; Ownby et al., 2002; Oziolor et al., 2014; Lindberg et al., 2017). Mutações no receptor de hidrocarbonetos aromáticos isoforma 2 (*AHR2*) foram observadas nesses peixes e estão relacionadas com uma alteração na resposta transcricional de genes regulados por este receptor como o citocromo *CYP1A* (Wirgin & Waldman, 2004; Yuan et al., 2006; Wirgin et al., 2011; Wojdylo et al., 2016). Mudanças na sinalização ou controle do receptor podem acontecer (Willis et al., 2010; Oziolor et al., 2014; Wojdylo et al., 2016), evidenciando uma rápida evolução (Wirgin et al., 2011).

A ausência ou resistência à indução da resposta de atividade do *CYP1A* é conhecida como resposta refratária do *CYP1A* e pode ser detectada por exposição em laboratório a substâncias agonistas do AHR (Wills et al., 2010). Em alguns casos, os

autores fazem referência à ausência de indução do *CYP1A* como resposta refratária (Elskus et al., 1999; Burnett et al., 2007; Jung & Di Giulio, 2010; Willis et al., 2010; Wojdylo et al., 2016), resposta recalcitrante (Oziolor et al., 2014; Lindberg et al., 2017) ou fenótipo refratário (Meyer et al., 2002; Powell et al., 2004; Wirgin & Waldman, 2004; Willis et al., 2009;). Nesses estudos, peixes de diferentes populações de locais contaminados e de referência foram expostos em experimentos de laboratório a concentração ou dose de um composto (por exemplo, BaP, BkF, BNF e PCB126) e a resposta do *CYP1A* é comparada com um grupo controle (Arzuaga & Elskus, 2002; Meyer et al., 2002; Willis et al., 2009; Jung & Di Giulio, 2010; Willis et al., 2010; Oziolor et al., 2014; Williams & Hubberstey, 2014; Wojdylo et al., 2016; Lindberg et al., 2017).

Ainda é desconhecido se este tipo de resposta ou fenótipo está presente em populações de peixes da América do Sul que habitam em locais com diferentes níveis históricos de poluição. Peixes Cyprinodontiformes que habitam o litoral sul-americano, como *P. vivipara*, e *P. caudimaculatus*, têm sido propostas como espécies modelo para avaliação de biomarcadores em toxicologia ambiental (Amado et al., 2009; Ferreira et al., 2012; Pinto et al., 2015; Ferreira et al., 2016).

As espécies estudadas têm alguma semelhança com outros peixes cyprinodontiforme, incluindo o killifish (por exemplo, *Fundulus heteroclitus*), por possuírem características que incluem abundância nos ambientes, ampla distribuição geográfica e adaptabilidade para viver sob diferentes condições ambientais.

O objetivo deste estudo foi avaliar a existência do fenótipo refratário do *CYP1A* em duas espécies de peixes da América do Sul presentes em locais com diferentes histórias de contaminação por HPA. Além disso, identificar se essa resposta ocorre em níveis de concentração que podem ser observados usando a abordagem tradicional de avaliação de fenótipo refratário, que consiste em comparar a resposta do *CYP1A* em peixes expostos a uma ou mais concentrações e um controle e duas novas abordagens alternativas, a comparação estatística dos valores de EC50 obtidos através de curvas dose-resposta de BNF a qual chamaremos de agora em diante, “comparação dos valores de EC50-*CYP1A*” e finalmente a comparação estatística do nível máximo de expressão obtido sob uma exposição a 10.000 η M de BNF, que chamamos de “expressão máxima” na concentração de exposição a 10.000 η M de BNF. Isso foi realizado com o propósito

de sugerir abordagens alternativas para avaliação da adaptação à contaminação dessas populações através da análise das respostas do *CYP1A*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e manutenção de peixes.

Machos e fêmeas de *Poecilia vivipara* e *Phalloceros caudimaculatus* foram coletados de dois sítios localizados em áreas adjacentes ao estuário da Lagoa dos Patos, no sul do estado do Rio Grande do Sul. A escolha destes locais foi baseada nos diferentes tipos e níveis de contaminação presentes nos sedimentos de cada local. O local poluído (P) está localizado próximo a um polo petroquímico (distribuidor e refinaria de petróleo) do município de Rio Grande com potencial contaminação por HPAs (32 ° 02 '56.48 "S, 52 ° 05' 06.98" O), com 4.414,0 $\eta\text{g HAP g}^{-1}$ de sedimento (16 HPAs prioritários da EPA), enquanto que o sítio considerado como referência (R), um curso de água na praia de Cassino com 62,8 $\eta\text{g de HAP. g}^{-1}$ de sedimento (32 ° 10'53,71 "S, 52 ° 8'51,97" O). Estes níveis de HPAs mencionados acima, para os locais P e R foram publicados por Chivittz e colaboradores (2016). Estudos anteriores também sugerem que o local P é contaminado por HPAs (Medeiros et al., 2005).

Os peixes foram levados ao laboratório e mantidos sob condições controladas com temperatura de 24°C, fotoperíodo 12:12, salinidade 5 e alimentação duas vezes ao dia com os ração comercial Tetra Color Bits Tropical (Tetra, São Paulo, SP, Brasil), até a produção de alevinos. As condições de manutenção foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal do Rio Grande (P009 / 2018) e autorização de pesquisa científica do ICMBio (SISBIO 60981-1).

2.2. Exposição dos peixes ao BNF.

Os alevinos de primeira geração foram expostos em água sob concentrações de 0 ηM , 10 ηM , 100 ηM , 1000 ηM e 10000 ηM de BNF para obter uma curva de sensibilidade de indução do *CYP1A*. Todos os grupos receberam como veículo DMSO a 0,5%. Os alevinos de dez dias de nascimento (n = 10 por grupo experimental) foram

expostos por um período de 24 horas em iguais condições da manutenção em laboratório na ausência de alimentação. Ao final do experimento, os alevinos foram anestesiados e eutanasiados por imersão em 500 mg.L⁻¹ de triclaína MS-222 (Sigma, St Louis, MO, EUA) e armazenados a -80 °C em Reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA., EUA).

2.3 Avaliação dos níveis de mRNA do *CYP1A*.

O RNA total foi isolado utilizando o reagente TRIzol e o mRNA foi convertido em cDNA com o kit de Transcrição Reversa de cDNA High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As análises de PCR em tempo real foram realizadas com o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA) e o sistema de PCR em tempo real 7300 (Applied Biosystems) usando o seguinte programa: 50 ° C por 2 min, 95 ° C por 2 min e 40 ciclos de 95 ° C por 15 se 60 ° C por 30 s para análise dos níveis transcricionais de *CYP1A* usando os primers específicos de *P. vivipara* forward 5'-CCGGAAGCTGGATGAGAACTCCAA-3' e reverse 5'-TCACTGCCCATGACAGACCAGTAG-3' para *CYP1A* e forward 5'-ACCATCACCGGAGTCCATGACGA-3' e reverse 5'-ATGTACGTTGCCATCCAGGCCGT-3' para β -actina, os primeiros foram previamente testados e usados por Dorrington et al. (2012) e Ferreira et al. (2012). Os primers específicos para PCR em tempo real de *P. caudimaculatus* foram, forward 5'-GAGGACCGGAAGCTGGATGAGAA-3' e reverse 5'-GCCCATGACAAACCAGTAGAGATGG-3' para *CYP1A* e forward 5'-ATGTACGTTGCCATCCAGGCCGT-3' e reverse 5'-ACCATCACCGGAGTCCATGACGA-3' para β -actin usados por Ferreira et al. (2016).

Os valores de RT-qPCR obtidos foram relativizados utilizando a metodologia proposta por Schmittgen & Livak (2008) para obter valores finais de expressão relativa $E^{-\Delta Ct}$.

2.4. Análise estatística

Avaliação do fenótipo refratário por comparação de grupos expostos e controle: A expressão relativa ($E^{-\Delta Ct}$) foi transformada logaritmicamente para atingir os

pressupostos de normalidade e homocedasticidade da ANOVA. A existência de diferenças na expressão do *CYP1A* entre os diferentes grupos expostos a BNF e controle foi verificada usando ANOVA de um fator e o teste de Tukey *Pos Hoc* com nível de significância de $p < 0,05$.

Para comparação dos valores de EC50-*CYP1A* foram testados múltiplos modelos de curvas de tendências para se ajustarem à expressão relativa dos valores de *CYP1A* ($E^{-\Delta ct}$) dos locais R e P para as duas espécies.

Modelos dose-resposta abrangem uma série de modelos estatísticos de regressão não linear, regressão linear (não) generalizada e análise de sobrevivência paramétrica (Ritz et al., 2015). Os parâmetros denotados com b, c, d, e, são estimados determinando valores de parâmetros que ajustam os dados de dose-resposta o mais próximo possível, conforme julgado por algum critério, que reflete os pressupostos de distribuição como mínimos quadrados ou máxima verossimilhança (Ritz 2010).

No nosso caso utilizamos o pacote DRC do Programa R (Ritz, 2016), para testar diferentes modelos que se ajustam às curvas dose-resposta, pois mais de sessenta funções para modelos dose-resposta conhecidas são parte do pacote. Os dados de sensibilidade de indução do *CYP1A* para verificar fenótipos refratários podem ser ajustados a essas curvas.

Testamos cinquenta e três modelos (logísticos, log-logísticos, log-normal, Weibulls, Cedergreen-Ritz-Streibig, etc.), com um, dois, três e quatro parâmetros específicos das equações dos modelos, especificando apenas um objeto para testar a falta de ajuste, comparando o modelo de regressão não linear com um modelo de ANOVA unidirecional ou bidirecional mais geral (função *modelfit*). Nesse caso, $p > 0,05$ indicará um modelo com bom ajuste, $p < 0,05$ (significante), isto significa que os dados não correspondem à regressão solicitada.

Modelos dose-resposta com o maior ajuste foram selecionados para as populações R e P, permitindo testar experimentos independentes simultaneamente. Gráficos para visualizar a eficácia do ajuste de nossos dados de indução foram construídos.

A curva de tendência fornecida pelo modelo permite observar a sensibilidade de indução do *CYP1A* obtido através das concentrações testadas.

A função ED foi usada para estimar a dose efetiva (EC_p / ED_p / IC_p). Usamos a função comParm, um teste para comparar os parâmetros (EC₅₀) de diferentes ensaios com os valores de p para a hipótese nula de que a diferença é igual do que 0, se os valores de p forem menores que 0,05, existem diferenças entre os parâmetros de acordo com as funções desenvolvidas por Ritz, 2016.

Para avaliar a “expressão máxima” de *CYP1A* foi realizada a comparação estatística do nível de expressão do *CYP1A* obtido pela exposição a 10.000 ηM BNF nos sítios R e P das duas espécies, aplicando-se um teste de t-Student com nível de significância de p <0,05. Os dados foram logaritmicamente transformados para atingir os pressupostos de normalidade e homocedasticidade do t-Student.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exposição das diferentes concentrações e do controle permitiu aplicar três abordagens para avaliação do fenótipo refratário do *CYP1A*. O primeiro amplamente utilizado para avaliar essa característica, consistindo na comparação estatística de grupos expostos e o controle de duas populações (R e P) e duas novas abordagens que sugerimos neste estudo, a comparação dos valores de EC₅₀ do *CYP1A* e a comparação dos valores de expressão do *CYP1A* na concentração máxima testada nas duas populações de *P. vivipara* e *P. caudimaculatus*.

3.1 Respostas transcricionais do *CYP1A* à BNF, comparado com o controle.

A exposição a concentrações de BNF testadas em alevinos de *P. vivipara*, não causou indução significativa de *CYP1A* (p > 0,05) em comparação com o controle na menor concentração testada de BNF (10 ηM) no local P, enquanto diferenças para a população do local R foram encontradas (Figura 3). Isto sugere, sob a definição tradicional de resposta refratária, a existência de um fenótipo refratário do *CYP1A* em uma baixa concentração de exposição para a população do local P.

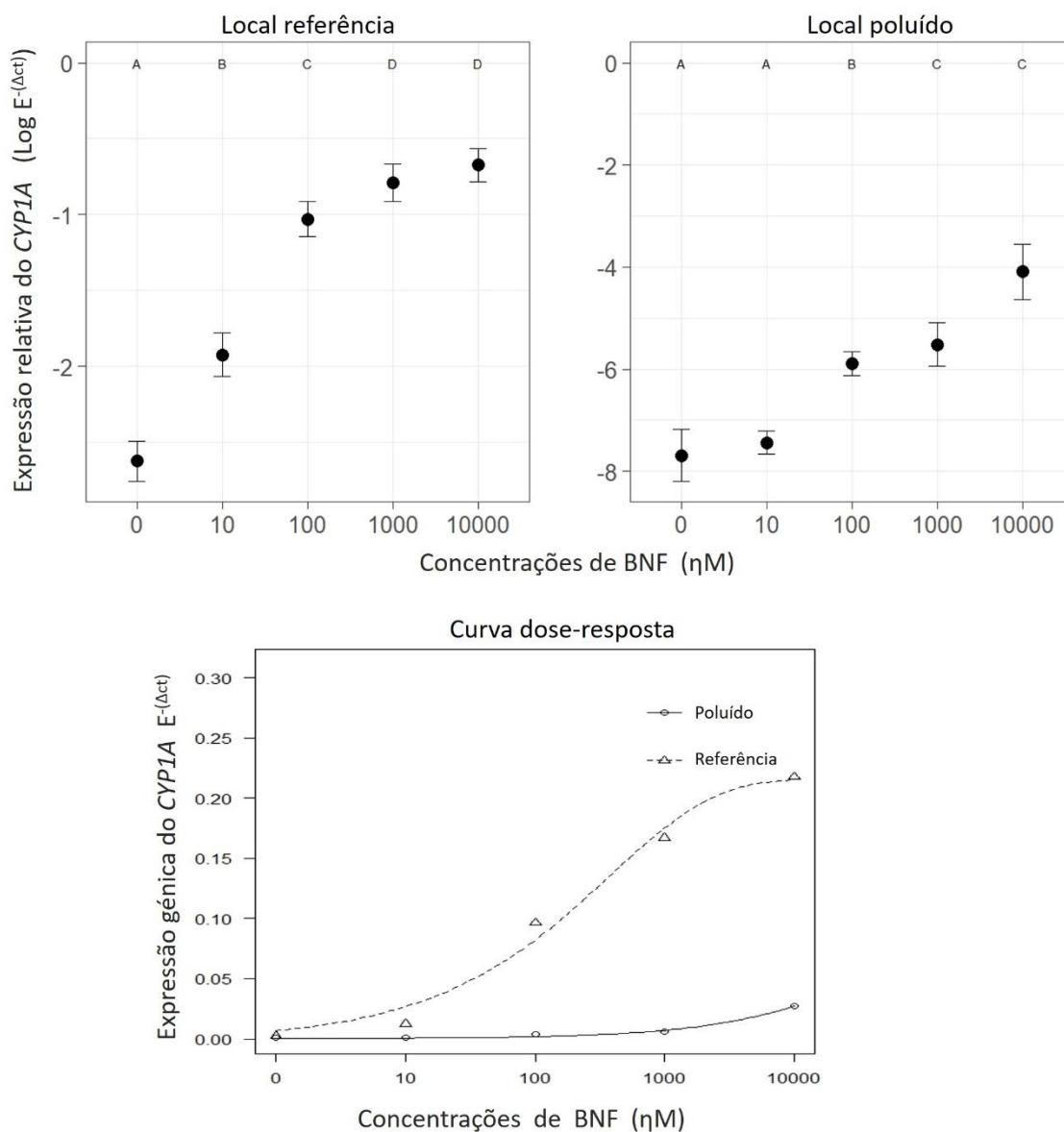


Figura 3. Níveis de *CYP1A* em alevinos F1 de *Poecilia vivipara* expostos a diferentes concentrações de BNF por 24h (média \pm DP). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA one-way, teste de Tukey *pos hoc*, $p < 0,05$); e curva dose-resposta do modelo ajustado ao local de referência e poluído (Weibull 2,4; $p = 0,63$).

Não foi possível identificar a existência de um fenótipo refratário do *CYP1A* em populações de *P. caudimaculatus*, devido a que os alevinos de ambas populações

apresentaram indução significativa de *CYP1A* em todas as concentrações de BNF testadas em relação ao controle (Figura 4).

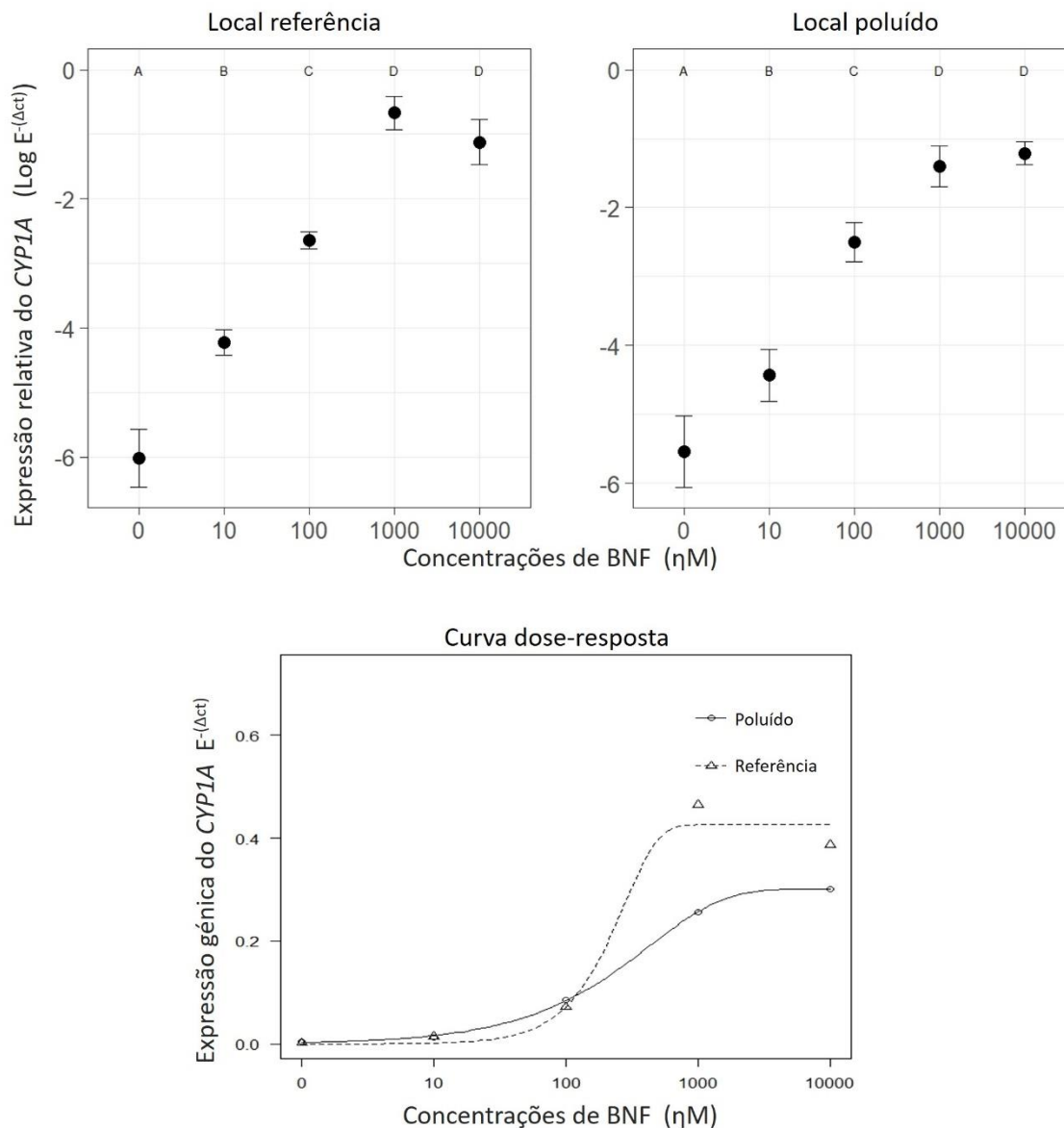


Figura 4. Níveis de *CYP1A* em alevinos F1 de *Phalloceros caudimaculatus* expostos a diferentes concentrações de BNF por 24h (média ± DP). Letras diferentes em cada indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA one-way, teste de Tukey *post hoc*, $p < 0,05$); e curva dose-resposta do modelo ajustada ao local de referência e contaminada (Weibull 2,3; $p = 0,30$).

Respostas semelhantes foram obtidas por Willis e colaboradores (2010), eles também utilizaram a técnica de RT-qPCR para quantificação do *CYP1A* em embriões de *F. heteroclitus* de locais referência e poluídos, encontrando diferenças significativas em relação ao controle e respostas recalcitrantes de expressão na população do local poluído.

No estudo de Oziolor e colaboradores (2014), indivíduos da espécie *F. grandis* foram expostos a quatro concentrações de PCB126 ou de uma mistura de PAHs, assim como um controle, e a atividade de *CYP1A* foi quantificada pelo ensaio enzimático EROD. Semelhante ao presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas nas duas menores concentrações que foram testadas (0.03 e 0.3 η M) enquanto no resto das concentrações testadas (1.5-306 η M) foram encontradas diferenças. Como no presente estudo, eles concluem a existência de fenótipo refratário, mesmo tendo encontrado indução de *CYP1A* em parte das concentrações testadas, tendo encontrado diferenças significativas na maioria das concentrações testadas.

3.2. Comparação dos valores de EC50-*CYP1A*

A resposta do *CYP1A* ao BNF nos peixes pode ser ajustada a uma curva dose-resposta, permitindo obter valores de concentração que causem cinquenta por cento de efeito (EC50) e uma comparação da sensibilidade em diferentes populações com base na comparação da EC50 obtida.

A fim de definir a sensibilidade da indução do *CYP1A* sob a exposição a BNF, testamos diferentes modelos dose-resposta para populações de peixes. Esta abordagem permitiu encontrar valores de EC50. Para *P. vivipara* do local R e P foi através de um modelo Weibull tipo 2, de quatro parâmetros (modelfit $p = 0,63$, Tabela 1). Para *P. caudimaculatus*, o modelo Weibull tipo 2 de três parâmetros foi o mais apropriado para o sítio R e P ($p = 0,3$, Tabela 1).

Tabela 1. Modelos com diferentes testes de falta de ajuste / adequação e valores EC50 de indução do *CYP1A* para exposição ao BNF. Valores de P abaixo de 0,05 indicam que o modelo não apresenta bom ajuste, neste caso são apresentados modelos com melhor

ajuste para as populações de *Phalloceros caudimaculatus* e *Poecilia vivipara*. * indica o modelo com o melhor ajuste.

	<i>Phalloceros caudimaculatus</i>	<i>Poecilia vivipara</i>
Log-logistic (3 parms)	0.28	0.52
Log-logistic (4 parms)	0.09	0.22
Logistic (3 parms)	0.03	0.00
Logistic (4 parms)	0.04	0.00
Log-normal (3 parms)	0.28	0.62
Log-normal (4 parms)	0.09	0.29
Weibull (type 1, 4 parms)	0.09	0.61
Weibull (type 2, 3 parm)	0.30 *	0.20
Weibull (type 2, 4 parms)	0.09	0.63 *

As curvas de indução do *CYP1A* para *P. vivipara* mostraram importantes diferenças nas respostas das populações P e R (Figura 1) enquanto que as duas populações de *P. caudimaculatus* foram semelhantes (Figura 4).

Os valores de EC50 foram calculados para duas populações através dos modelos escolhidos para cada espécie (Tabela 2), para determinar se as populações possuem ou não sensibilidade diferente e se poderiam ter uma resposta refratária que pode ser evidenciada em diferentes níveis de sensibilidade para a indução do *CYP1A*. Estes valores de EC50 permitiram comparar a sensibilidade das espécies em estudos de ecotoxicologia de xenobióticos (Ritz et al., 2005).

Tabela 2. Valores de EC50 da indução do *CYP1A* para exposição a BNF nas populações do local de referência e poluído para as duas espécies de guarús avaliadas, obtidos a partir dos modelos dose-resposta mais adequados aos nossos dados. *indica diferenças estatísticas entre os valores de EC50 do local de referência e poluído.

Espécies	Modelo	Local	EC50 ηM
<i>Phalloceros caudimaculatus</i>	Weibull (type 2, 3 parms)	Referência	220.2
		Poluído	265.2
<i>Poecilia vivipara</i>	Weibull (type 2, 4 parms)	Referência	190.9
		Poluído	15905.8*

Se os valores de EC50 do *CYP1A* são estatisticamente significativos, podemos afirmar que as populações desenvolveram diferentes níveis de sensibilidade à indução do *CYP1A* e que, neste caso, a resposta refratária estaria se desenvolvendo em diferentes níveis de sensibilidade dentro da faixa de concentrações testadas.

Os valores de EC50 para populações de *P. vivipara* foram 190,9 e 15905,8 η M para o local de referência e poluído, respectivamente. Esses valores apresentaram diferenças estatísticas entre eles ($p < 0,05$). Para a espécie *P. caudimaculatus*, os valores de EC50 foram 220,2 e 265,2 η M BNF para os locais poluídos e de referência, respectivamente ($p > 0,05$), sendo a sensibilidade da indução do *CYP1A* semelhantes.

Os alevinos de *P. vivipara* do local P apresentaram diferenças na sensibilidade da indução do CYP1A, o que pode representar uma adaptação no nível molecular nessa população. Com base nisso, sugere-se que valores de EC50 sejam utilizados para avaliar a adaptação de populações de peixes poecilídeos da América do Sul, ao invés da ausência de resposta que caracteriza a "resposta refratária" do *CYP1A*, classicamente usada em estudos com populações de peixes como killifish na América do Norte.

3.3 Comparação da expressão máxima de *CYP1A* a 10.000 η M BNF

O nível de expressão do *CYP1A* após a exposição à 10.000 η M de BNF foi alta em relação aos controles nas populações de referência para ambas as espécies. Para o sítio R, os valores médios de expressão foram $0,22 \pm 0,06$ para *P. vivipara* e $0,39 \pm 0,11$ para *P. caudimaculatus*, enquanto que para o sítio P $0,02 \pm 0,01$ para *P. vivipara* e $0,17 \pm 0,03$ para *P. caudimaculatus* (Figura 5). Esta abordagem permitiu encontrar diferenças significativas entre as duas populações das duas espécies ($p < 0,05$), evidenciando que estão em diferentes estágios de sensibilidade de indução do *CYP1A*.

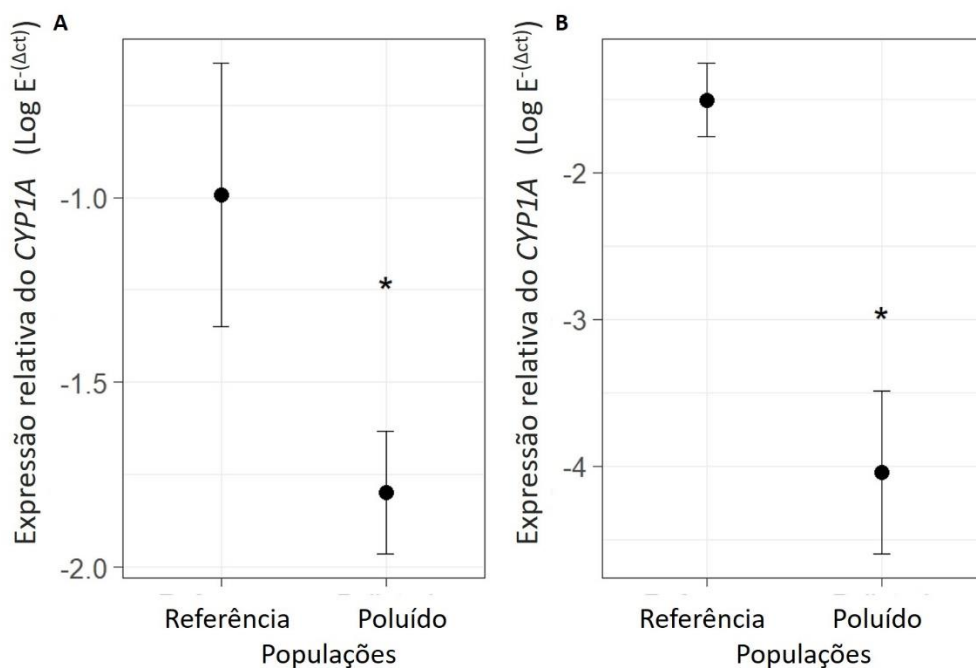


Figura 5. Níveis de expressão de *CYP1A* em alevinos após exposição à maior concentração testada de 10.000 η M BNF. *Phalloceros caudimaculatus* (A) e *Poecilia vivipara* (B) que nasceram em laboratório a partir de peixes coletados nos locais de referência e poluído. *indicam diferenças estatísticas (n = 6 por grupo, T-student p <0,05).

3.4. Avaliação do fenótipo refratário do *CYP1A* em guppies

Este estudo foi capaz de sugerir, pela primeira vez, abordagens alternativas para comparar as capacidades adaptativas de populações de poecilídeos de dois locais com diferentes históricos de contaminação ambiental. O uso do endpoint usual para avaliação do fenótipo refratário do *CYP1A*, comparando peixes expostos a compostos semelhantes à dioxina e controle, é comum em estudos com peixes norte-americanos (Willis et al., 2009; Wills et al., 2010). No caso dos guppies sul-americanos, a ausência de indução do *CYP1A* pela exposição a uma concentração fixa de BNF em comparação com o controle não parece ser o critério mais apropriado para avaliar as adaptações relacionadas ao *CYP1A* em populações de peixes. Esta abordagem diferencia as populações de *P. vivipara* dos sítios P e R em apenas uma das concentrações de BNF testadas (10 η M) e não diferenciou as populações de *P.*

caudimaculatus dos sítios P e R. A segunda abordagem, pela comparação do EC50 das curvas de resposta do *CYP1A* para exposição ao BNF, mostrou resultados semelhantes, evidenciando uma resposta refratária do *CYP1A* para *P. vivipara* do sítio P, e não evidenciando esta resposta para *P. caudimaculatus* do sítio P. Assim, sugerimos o uso da comparação estatística dos valores de EC50 usando o pacote DRC do programa R como um caminho promissor para avaliar a existência de respostas refratárias do *CYP1A* em populações de peixes adaptados a locais impactados por contaminantes. Além da abordagem de análise da curva dose-resposta, a comparação estatística dos níveis de expressão do *CYP1A* obtidos após a exposição a 10.000 η M parece ser a melhor alternativa para diferenciar a sensibilidade das populações de peixes da América do Sul com diferentes contaminações históricas pelos HPA. Esta abordagem poderia ser testada isolada ou complementada com a análise de curvas dose-resposta e valores de EC50 comparados estatisticamente, proporcionando maior robustez aos estudos relacionados aos fenótipos refratários do *CYP1A*. Segundo Wirgin e Waldman (2004), a resistência à indução do *CYP1A* parece estar associada a custos significativos para as espécies de peixes. Por exemplo, o *Fundulus heteroclitus* que se adaptou ou evoluiu para sobreviver a poluição da HAP conseqüentemente tem alterações no metabolismo energético (Lindberg et al., 2017). A diminuição da capacidade de indução do *CYP1A* observada aqui para duas espécies de populações de guppies sul-americanos que habitam um local historicamente contaminado com HPA poderia ter implicações ecológicas para eles. Futuros estudos poderiam ser realizados, utilizando a abordagem aqui apresentada para identificar novas populações de peixes silvestres que desenvolveram adaptação à poluição e estudando os mecanismos moleculares envolvidos nessas adaptações.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., Yunes, J. S., Monserrat, J. M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science Total Environment*.407: 2115–23.
- Araújo, F. G., Peixoto, M. G., Pinto, B.C. T., Teixeira, T. P. (2009). Distribution of guppies *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) and *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) along a polluted stretch of the Paraíba do Sul River, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 69(1), 41-48.
- Arzuaga, X., Elskus, A. 2002. Evidence for resistance to benzo[a]pyrene and 3,4,3'4'-tetrachlorobiphenyl in a chronically polluted *Fundulus heteroclitus* population. *Marine Environmental Research* 54, 247–251.
- Bello, S. M., Franks, D. G., Stegeman, J. J., Hahn, M. E. 2001. Acquired resistance to Ah receptor agonists in a population of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a marine superfund site: in vivo and in vitro studies on the inducibility of xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicological Sciences*, 60(1), 77-91.
- Brown, D. R., Clark, B. W., Garner, L. V. T., Di Giulio, R. T. 2016. Embryonic cardiotoxicity of weak aryl hydrocarbon receptor agonists and *CYP1A* inhibitor fluoranthene in the Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 188, 45-51.
- Chivittz, C. C., Pinto, D. P., Ferreira, R. S., Sopezki, M. da S., Fillmann, G., Zanette, J. 2016. Responses of the *CYP1A* biomarker in *Jenynsia multidentata* and *Phalloceros caudimaculatus* and evaluation of a *CYP1A* refractory phenotype. *Chemosphere*, 144, 925–931.
- De Souza Machado, A. A., Hoff, M. L. M., Klein, R. D., Cardozo, J. G., Giacomini, M. M., Pinho, G. L. L., Bianchini, A. 2013. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. *Aquatic toxicology*, 138, 60-69.
- De Souza Machado, A. A., Hoff, M. L. M., Klein, R. D., Cordeiro, G. J., Avila, J. M. L., Costa, P. G., & Bianchini, A. 2014. Oxidative stress and DNA damage

- responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivipara*. *Marine environmental research*, 98, 96-105.
- Elskus, A. A., Monosson, E., McElroy, A. E., Stegeman, J. J., Woltering, D. S. 1999. Altered *CYP1A* expression in *Fundulus heteroclitus* adults and larvae: a sign of pollutant resistance?. *Aquatic Toxicology*, 45(2-3), 99-113.
- Ferreira, R. S., Monserrat, J. M., Ferreira, J. L. R., Kalb, A. C., Stegeman, J., Bainy, A. C. D., Zanette, J. 2012. Biomarkers of organic contamination in the South American fish *Poecilia vivipara* and *Jenynsia multidentata*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75(16-17), 1023-1034.
- Ferreira, R. S., da Cruz Chivittz, C., dos Santos, G. S., Zanette, J. 2016. Cytochrome P450 1A mRNA in the guppy *Phalloceros caudimaculatus* and response to beta-naphthoflavone and environmental samples. *Aquatic Toxicology*, 181, 86-93.
- Froese, R., and Pauly, D. (Eds.). 2018. FishBase. Electronic publication. www.fishbase.org (accessed October 2018).
- Harayashiki, C. A. Y., Junior, A. S. V., de Souza Machado, A. A., da Costa Cabrera, L., Primel, E. G., Bianchini, A., Corcini, C. D. 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquatic toxicology*, 142, 176-184.
- Jung, D., Di Giulio, R. T. 2010. Identification of mitochondrial cytochrome P450 induced in response to polycyclic aromatic hydrocarbons in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(1), 107-112.
- Karimzadeh, K. 2016. Effects of Beta-Naphthoflavone and 3-Methylcholanthren on Biochemical Markers in Sturgeon Fish, *Huso huso*. *Iranian Journal of Toxicology* Vol, 10(3), 14-17.
- Lindberg, C. D., Jayasundara, N., Kozal, J. S., Leuthner, T. C., Di Giulio, R. T. 2017. Resistance to polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity and associated bioenergetic consequences in a population of *Fundulus heteroclitus*. *Ecotoxicology*, 26(3), 435-448.
- Lucinda, P.H.F., 2008. Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros* Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae), with the description of twenty-one new species. *Neotropical Ichthyology*. 6 (2), 113-158.

- Mattos, J. J., Siebert, M. N., Luchmann, K. H., Granucci, N., Dorrington, T., Stoco, P. H., Bairy, A. C. 2010. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. *Marine environmental research*, 69, S31-S33.
- Medeiros, P.M., Bicego, M.C., Castelo, R.M., Rosso, C.D., Fillmann, G., Zamboni, A.J., 2005. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environ. Int.* 31, 77-87.
- Meyer, J.N., Nacci, D.E., Di Giulio, R.T., 2002. Cytochrome P4501A (*CYP1A*) in killifish (*Fundulus heteroclitus*): heritability of altered expression and relationship to survival in contaminated sediments. *Toxicology. Science.* 68, 69–81.
- Nacci, D. E., Kohan, M., Pelletier, M., George, E. 2002. Effects of benzo [a] pyrene exposure on a fish population resistant to the toxic effects of dioxin-like compounds. *Aquatic Toxicology*, 57(4), 203-215.
- Nacci, D.E., Champlin, D., Jayaraman, S. 2010. Adaptation of the Estuarine Fish *Fundulus heteroclitus* (Atlantic Killifish) to Polychlorinated Biphenyls (PCBs). *Estuaries and Coasts* 33, 853-864.
- Pinto, D.P., Chivittz, C.C., Ferreira, R.S., Sopezki, M.S., Zanette, J., 2015. Betanaphthoflavone-induced *CYP1A* expression in the guppy *Jenynsia multidentata*: time-dependent response, anesthetic MS-222 effect and fin analysis. *Ecotoxicology. Environmental. Safety.* 113, 38–44
- Ownby, D.R., Newman, M.C., Mulvey, M., Vogelbein, W.K., Unger, M.A., Arzayus, L.F., 2002. Fish (*Fundulus heteroclitus*) populations with different exposure histories differ in tolerance of creosote-contaminated sediments. *Environmental Toxicology Chemistry.* 21, 1897–1902.
- Oziolor, E. M., Bigorgne, E., Aguilar, L., Usenko, S., & Matson, C. W. (2014). Evolved resistance to PCB-and PAH-induced cardiac teratogenesis, and reduced *CYP1A* activity in Gulf killifish (*Fundulus grandis*) populations from the Houston Ship Channel, Texas. *Aquatic Toxicology*, 150, 210-219.
- Powell, W. H., Morrison, H. G., Weil, E. J., Karchner, S. I., Sogin, M. L., Stegeman, J. J., Hahn, M. E. 2004. Cloning and analysis of the *CYP1A* promoter from the atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Marine environmental research*, 58(2-5), 119-124.

- Ritz C, Streibig JC. 2005. Bioassay Analysis using R. *J Stat Softw.* 12:1–22
- Ritz C. Towards a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. *Environmental Toxicology Chemistry.* 2010; 29:220–229
- Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. 2015. Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, 10(12): e0146021.
- Roling, J. A., Bain, L. J., Baldwin, W. S. 2004. Differential gene expression in mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) following treatment with pyrene: comparison to a creosote contaminated site. *Marine environmental research*, 57(5), 377-395.
- D R Robertson D. E., Peña, E.A., Posada, J. M., Claro, R. 2015. Peces Costeros del Gran Caribe: sistema de Información en línea. Version 1.0 Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, Balboa, República de Panamá
- Rowley, J. J. L., Rayner, T. S., Pyke, G. H. 2005 New records and invasive potential of the poeciliid fish *Phalloceros caudimaculatus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 39:5, 1013-1022.
- Thibault, R. E., Schultz, R. J. 1978. Reproductive adaptations among viviparous fishes (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Evolution*, 32(2), 320-333.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Natural Protocols*, 3 (6), 1101–1108.
- Shiogiri, N. S., Carraschi, S. P., Cubo, P., Schiavetti, B. L., da Cruz, C., Pitelli, R. A. 2010. Ecotoxicity of glyphosate and a terbanes® surfactant on guarú (*Phalloceros caudimaculatus*). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 32(3), 285-289.
- Wang, L., Camus, A. C., Dong, W., Thornton, C., & Willett, K. L. 2010. Expression of CYP1C1 and CYP1A in *Fundulus heteroclitus* during PAH-induced carcinogenesis. *Aquatic toxicology*, 99(4), 439-447.
- Wassenberg, D. M., Di Giulio, R. T. 2004. Teratogenesis in *Fundulus heteroclitus* embryos exposed to a creosote-contaminated sediment extract and CYP1A inhibitors. *Marine environmental research*, 58(2-5), 163-168.
- Williams, R., Hubberstey, A. V. 2014. Benzo (a) pyrene exposure causes adaptive changes in p53 and CYP1A gene expression in Brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Aquatic toxicology*, 156, 201-210.

- Wills, L. P., Zhu, S., Willett, K. L., Di Giulio, R. T. 2009. Effect of *CYP1A* inhibition on the biotransformation of benzo [a] pyrene in two populations of *Fundulus heteroclitus* with different exposure histories. *Aquatic toxicology*, 92(3), 195-201.
- Wills, L.P., Matson, C.W., Landon, C.D., Di Giulio, R.T. 2010. Characterization of the recalcitrant CYP1 phenotype found in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a superfund site on the Elizabeth River, VA. *Aquat. Toxicol.* 99, 33e41.
- Wirgin I, Waldman JR. 2004. Resistance to contaminants in North American fish populations. *Mutations Research*. 2004; 552:73–100.
- Wirgin, I., Roy, N. K., Loftus, M., Chambers, R. C., Franks, D. G., Hahn, M. E. 2011. Mechanistic basis of resistance to PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River. *Science*, 331(6022), 1322-1325.
- Wojdylo, J. V., Vogelbein, W., Bain, L. J., Rice, C. D. 2016. AHR-related activities in a creosote-adapted population of adult atlantic killifish, *Fundulus heteroclitus*, two decades post-EPA superfund status at the Atlantic Wood Site, Portsmouth, VA USA. *Aquatic Toxicology*, 177, 74-85.
- Yuan, Z., Wirgin, M., Courtenay, S., Ikonomou, M., Wirgin, I. 2001. Is hepatic cytochrome P4501A1 expression predictive of hepatic burdens of dioxins, furans, and PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River estuary?. *Aquatic Toxicology*, 54(3-4), 217-230.
- Yuan, Z., Courtenay, S., Chambers, R. C., Wirgin, I. 2006. Evidence of Spatially Extensive Resistance to PCBs in an Anadromous Fish of the Hudson River. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 77–84.

16 Abstract

17 The inability to induce cytochrome P4501A by dioxin-like compounds is a well
18 studied characteristic of fish populations inhabiting highly contaminated sites in North
19 America. We aimed to investigate the existence of the *CYP1A* refractory phenotype in
20 populations of South American guppies *Poecilia vivipara* and *Phalloceros*
21 *caudimaculatus* from two sites in the Rio Grande city (RS, Brazil) with different levels
22 of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the sediment. First-generation (F1)
23 fingerling were 24-h waterborne exposed to concentrations of 0, 10, 100, 1,000 and
24 10,000 η M of beta-naphthoflavone (BNF) and *CYP1A* mRNA expression was
25 determined using RT-qPCR. Firstly, we used the usual endpoint for *CYP1A* refractory
26 phenotype evaluation, by comparing fish exposed to BNF and control. The
27 concentration of 10 η M evidenced a *CYP1A* refractory phenotype in *P. vivipara* from
28 polluted site (P) but was not evident for higher BNF concentrations and was absent for
29 *P. caudimaculatus*. Then, we used two alternative endpoints for evaluation of altered
30 *CYP1A* response capacities in distinct populations: 1) the statistical comparison of EC50
31 of BNF dose-response curves using the DRC package of the R program and 2)
32 statistical comparison of maximum *CYP1A* level through exposure to 10,000 η M BNF.
33 The EC50 values for reference (R) and P sites, denoted an altered *CYP1A* induction
34 capacity for *P. vivipara* (190.8 η M and 15905.7 η M BNF, respectively, $p < 0.05$) but not
35 for *P. caudimaculatus* (220.2 and 265.2 η M BNF, respectively, $p = 0.47$). The relative
36 *CYP1A* level to 10,000 η M BNF was higher in population from R site (*P. vivipara*
37 0.22 ± 0.06 ; *P. caudimaculatus* 0.39 ± 0.11) than P site (*P. vivipara* 0.02 ± 0.01 ; *P.*
38 *caudimaculatus* 0.17 ± 0.03) for both guppies. This is the first study to systematically
39 evaluate the *CYP1A* refractory phenotype in guppies. The results point out that EC50

40 and maximum *CYP1A* induction to 10,000 nM BNF are promise endpoints to
41 identification of *CYP1A* refractory phenotype in fish.

42

43 Keywords: PAH, AHR, aquatic pollution, *CYP1A*, refractory phenotype.

44

45 **1. Introduction**

46 Fish from urban and industrialized estuaries are exposed to the highest
47 contaminant levels of any vertebrate population (Wirgin and Waldman, 2004). Some
48 fish populations in North America as *Fundulus heteroclitus*, *Fundulus grandis* and
49 *Microgadus tomcod*, have developed molecular alterations that allowed them to inhabit
50 sites with high levels of polyhalogenated and polycyclic aromatic hydrocarbons
51 (pHAHs and PAHs) (Elskus et al., 1999; Wirgin and Waldman, 2004; Nacci et al.,
52 2010; Wills et al., 2010; Oziolor et al., 2014; Wojdylo et al., 2016; Lindberg et al. al.,
53 2017). The resistance may be caused by genetic adaptation or physiological acclimation,
54 the distinction between these possibilities is important to predict the persistence of
55 resistance and its possible costs to affected populations and communities (Meyer et al.,
56 2002; Ownby et al., 2002; Wirgin and Waldman, 2004). Adaptation is the genetic
57 process by which a population changes to accommodate environmental factors and
58 acclimatization are the physiological changes that an individual makes to minimize the
59 effects of stressors (Meyer et al., 2002; Ownby et al., 2002).

60 In the case of adaptation, the resistance to contaminants is transferred to the
61 following generations (Meyer et al., 2002; Ownby et al., 2002; Oziolor et al., 2014;
62 Lindberg et al., 2017). For example, mutations in the aryl hydrocarbon receptor 2
63 (AHR2) have been observed in fish and are related to an alteration in the transcriptional
64 response of genes regulated by this receptor as the *cytochrome P450 1A (CYP1A)*;

65 Wirgin and Waldman , 2004; Yuan et al., 2006; Wirgin et al., 2011; Wojdylo et al.,
66 2016). Changes in the receptor signaling or control is likely (Willis et al., 2010; Oziolor
67 et al., 2014; Wojdylo et al., 2016), evidencing a rapid evolution in fish (Wirgin et al.,
68 2011).

69 The lack of induction of *CYP1A* mRNA or CYP1A activity (i.e. EROD) is
70 known as the *CYP1A* refractory response, and can be detected by exposure in laboratory
71 to AHR agonist substances such pHAHs and PAHs (Wills et al., 2010). In some cases,
72 authors have reference to the absence of induction of *CYP1A* as refractory response
73 (Elskus et al., 1999; Burnett et al., 2007; Jung and Di Giulio, 2010; Willis et al., 2010;
74 Wojdylo et al. , 2016), recalcitrant response (Lindberg et al., 2017; Oziolor et al., 2014)
75 or refractory phenotype (Meyer et al., 2002; Powell et al., 2004; Willis et al., 2009;
76 Wirgin and Waldman, 2004). In most of those studies, fish from different populations
77 from contaminated and reference sites were exposed to concentration or dose of the
78 compound (e.g. BaP, BkF, BNF and PCB126) and the *CYP1A* response was compared
79 with a control group in laboratory experiments (Arzuaga and Elskus, 2002; Meyer et al.,
80 2002; Willis et al., 2009; Jung and Di Giulio, 2010; Willis et al., 2010; Oziolor et al.,
81 2014; Williams and Hubberstey, 2014; Wojdylo et al., 2016; Lindberg et al., 2017). It is
82 unknown if this type of response is present in fish populations of the South America
83 inhabiting sites with different historical levels of pollution. Cyprinodontiform fish that
84 inhabit the South American Coast, such as *Poecilia vivipara* (Poecilidade) from
85 Suriname to Brazil (Froese and Pauly 2018), and *Phalloceros caudimaculatus*
86 (Poecillidae) in freshwater and estuarine environments of Brazil, Argentina, Paraguay
87 and Uruguay, have been suggested as model species for biomarkers evaluation in
88 environmental toxicology (Amado et al., 2009; Ferreira et al., 2012; Pinto et al., 2015;

89 Ferreira et al., 2016). Those fishes have some similarity to other cyprinodontiforme
90 fishes including killifish (e.g. *Fundulus heteroclitus*), by possessing characteristics that
91 include abundance in the environment, a wide geographic distribution, and adaptability
92 to live in different environmental conditions.

93 The aim of this study was to evaluate, for the first time, the existence of the
94 *CYP1A* refractory phenotype in two species of South American fish present in sites with
95 different histories of contamination by PAHs. Firstly, we tested the usual endpoint,
96 which consists in comparing the *CYP1A* response of fish exposed to one or more
97 concentrations of an AHR agonist (i.e. beta-naphthoflavone; BNF) and compared to a
98 control. Then, we tested two alternative endpoints for evaluation of altered *CYP1A*
99 response capacities in distinct populations: 1) the statistical comparison of EC50 of
100 BNF dose-response curves using the DRC package of the R program and 2) statistical
101 comparison of maximum *CYP1A* level through exposure to 10,000 η M BNF.

102

103 **2. Materials and Methods**

104 2.1. Fish collection and maintenance

105 Male and female *Poecilia vivipara* and *Phalloceros caudimaculatus* were
106 collected from two sites located in areas adjacent of the Patos Lagoon Estuary in the
107 southern state of Rio Grande do Sul, RS, Brazil. The sites were selected to represent
108 different magnitudes of contamination. The polluted site (P) is close to places that have
109 historically received effluent of domestic and industrial activities (Medeiros et al., 2005;
110 Garcia et al., 2010; Chivittz et al., 2016) and is located near a petrochemical pole
111 (petroleum distributor and refinery) of the city with potential PAH contamination
112 (Medeiros et al., 2005) (32° 02' 56.48"S, 52° 05' 06.98"O). The site considered here as a
113 reference site (R) is a watercourse at Cassino Beach distant approximately 15 Km from

114 the P site (32°10'53.71"S, 52° 8'51.97"O). The evaluation of the sum of 16 priority
115 PAHs in sediment of those two streams was performed by our research group before
116 (Chivittz et al., 2016) and confirmed the presence of higher PAH levels in the P site
117 than R site (4414.0 ng g⁻¹dw and 62.8 ng g⁻¹ dw, respectively, considering the Σ 16 EPA
118 priority PAHs).

119 The fish were taken to the laboratory and kept under controlled conditions at
120 temperature 24°C, photoperiod 12:12, salinity 5 and feeding twice a day with the
121 commercial Tetra Color Bits Tropical Granules (Tetra, Sao Paulo, SP, Brazil), until
122 producing fingerlings. The maintenance conditions were approved by the Ethics
123 Committee on Animal Use of the Rio Grande Federal University (P009/2018) and
124 authorization of scientific research of ICMBio (SISBIO 60981-1).

125 2.2. BNF exposure experiment

126 First generation fingerlings were waterborne exposed to 0 η M, 10 η M, 100 η M,
127 1000 η M and 10000 η M of BNF to obtain an induction sensitivity curve of *CYP1A*. All
128 groups received the vehicle DMSO at 0.5%. The fingerlings of ten days of birth (n = 10
129 per experimental group) were exposed for a period of 24 h on the same conditions of
130 maintenance in the laboratory in the absence of feeding. At the end of the experiment,
131 the fingerlings were anesthetized and euthanized by immersion in 500 mg.L⁻¹ tricaine
132 MS-222 (Sigma, St Louis, MO, USA) and stored at - 80 °C in TRIzol Reagent
133 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

134 2.3 Quantification of *CYP1A* mRNA levels

135 Total RNA was isolated using TRIzol Reagent and mRNA was converted to
136 cDNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems,
137 Foster City, CA, USA). Real-time PCR analyses were performed with GoTaq qPCR

138 Master Mix kit (Promega, Madison, WI, USA) and real time PCR System 7300
 139 (Applied Biosystems) using the following program: 50 °C for 2 min, 95 °C for 2 min
 140 and 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 30 s for analysis of *CYP1A* transcriptional
 141 levels using the *P. vivipara* specific primers forward 5'-
 142 CCGGAAGCTGGATGAGAACTCCAA-3' and reverse
 143 5'-TCACTGCCCATGACAGACCAGTAG-3' for *CYP1A* and forward 5'-5'-
 144 ACCATCACCGGAGTCCATGACGA-3' and reverse
 145 ATGTACGTTGCCATCCAGGCCGT-3' β -actin were previously tested and used by
 146 Dorrington et al. (2012) and Ferreira et al. (2012). The *P. caudimaculatus* specific
 147 primers for real time forward 5'-GAGGACCGGAAGCTGGATGAGAA-3' and reverse
 148 5'-GCCCATGACAAACCAGTAGAGATGG-3' for *CYP1A* and forward 5'-
 149 ATGTACGTTGCCATCCAGGCCGT-3' and reverse 5'-
 150 ACCATCACCGGAGTCCATGACGA-3' for β -actin used by Ferreira et al. (2016).
 151 The RT-qPCR values obtained were relativized using the methodology proposed by
 152 Schmittgen and Livak (2008) to obtain final values of relative expression as $E^{-\Delta Ct}$.

153

154 2.4. Statistical analyses

155 Refractory phenotype evaluation by comparison of exposed groups and control:
 156 The relative expression ($E^{-\Delta Ct}$) were logarithmically transformed to fit the ANOVA
 157 assumptions of normality and homoscedasticity and the existence of differences in the
 158 expression of *CYP1A* among the different BNF exposed groups and control were done
 159 by one-way ANOVA and Tukey Pos Hoc test with significance level of $p < 0.05$.

160 For comparison of *CYP1A*-EC50 values, multiple models of trend curves were
 161 tested to fit relative expression of *CYP1A* values ($E^{-\Delta Ct}$) of the R and P sites for the two

162 fishes. Dose-response models encompass a range of statistical models from nonlinear
163 regression, generalized (non) linear regression, and parametric survival analysis (Ritz et
164 al., 2015). The parameters denoted with b, c, d, e, are estimated by determining
165 parameter values such that f fits the dose–response data as closely as possible as judged
166 by some criterion, which reflects the distributional assumptions as least squares or
167 maximum likelihood (Ritz 2010).

168 In our case we used the Program R, with the package DRC (Dose Response
169 Curves; Ritz, 2016), to test different models that fit to dose-response curves, because
170 more than sixty well-known model functions are built-in in this package. *CYP1A*
171 induction sensitivity data to test refractory responses can be fitted to these curves.

172 We tested fifty-three models (e. g. logistic, log-logistic, log-normal, Weibulls,
173 Cedergreen-Ritz-Streibig, etc.), with one, two, three and four specific parameters of the
174 equations of the models, specifying only a single object gives a test for lack-of-fit,
175 comparing the non-linear regression model to a more general one-way or two-way
176 ANOVA model (modelfit function). In this case, $p > 0.05$ will indicate a model good fit,
177 and $p < 0.05$ (significant) will indicate that the data do not correspond to the requested
178 regression. Concentration-response models with the best adjustment were selected to the
179 R and P populations, allowing to test independent experiments simultaneously. Graphs
180 to visualize the effectiveness of the adjustment of our induction data was constructed.

181 The trend curve provided by the model allows to observe the sensitivity of
182 induction of the *CYP1A* obtained through the concentrations tested. The ED function
183 was used to estimate the effective dose (EC_p/ED_p/IC_p). We used the comParm
184 function, a test to compare parameters (EC₅₀) from different assays with the p-values

185 for the null hypothesis that the difference equals 0. If p values are less than 0.05 there
186 are differences between the parameters.

187 The analysis of maximum expression of exposed concentration was done by
188 statistical comparison of the maximum level of expression of *CYP1A* obtained through
189 exposure to 10,000 η M BNF in the R and P sites of the two species. The comparison
190 was done by applying a t-Student test with a significance level of $p < 0.05$ on the R and
191 P sites of *P. vivipara* and *P. caudimaculatus*. Data were logarithmically transformed to
192 fit the t-Student assumptions of normality and homoscedasticity.

193

194 **3. Results and Discussion**

195

196 3.1 *CYP1A* transcriptional responses to BNF, compared to the control

197 Exposure of *P. vivipara* fingerlings to the lowest tested BNF concentration of 10
198 η M did not cause significant induction of *CYP1A* compared to control for the population
199 of P site ($p > 0.05$), while 10 η M BNF caused induction of *CYP1A* for the population of
200 R site ($p < 0.05$) (Figure 1). This result suggests, under the traditional definition of
201 refractory response, the existence of a refractory phenotype of *CYP1A* in the population
202 of *P. vivipara* from the site P. For BNF concentration between 100 and 10,000 η M
203 BNF, the *CYP1A* induction comparing to control, was observed for P and R
204 populations, and thus, the *CYP1A* refractory response for P was not detected using those
205 concentrations.

206 Most studies evaluating *CYP1A* refractory response in fish uses the laboratory
207 exposure to a fixed dose of concentration of a AHR agonist compound and comparison
208 to a control to identify the possible inability to induce *CYP1A* (Elskus et al., 1999;

209 Arzuaga and Elskus 2002; Willis et al 2009; Jung and Di Giulio 2010; Williams and
210 Hubberstey 2014; Wojdylo et al., 2016; Lindberg et al., 2017). Few studies have
211 compared the *CYP1A* responses for multiple concentrations or doses of those
212 compounds (Nacci et al., 2002; Oziolor et al., 2014; Brown et al., 2016; Brown and Di
213 Giulio 2016). Oziolor et al. (2014) tested four concentrations plus one control in the
214 killifish *Fundulus grandis* quantifying EROD activity using the PCB126 and a mixture
215 of PAHs. Similar with the present study, they not found significant differences between
216 exposed and control in the two lowest tested concentrations (0.03 e 0.3 η M), while in
217 the rest of the concentrations the *CYP1A* induction occurred (1.5-306 η M) when levels
218 were compared to control. They conclude the existence of recalcitrant responses, even
219 considering significant *CYP1A* induction in the majority of tested concentrations
220 comparing to control. Those results suggest that the use of multiple concentrations of
221 AHR agonist compounds could be preferred to test the *CYP1A* refractory phenotype in
222 fish populations.

223 We were not able to find the existence of a *CYP1A* refractory phenotype in
224 populations of *P. caudimaculatus* using this approach because there was significant
225 induction in all tested concentrations compared to the control in fingerlings of both P
226 and R populations (Figure 2).

227

228 3.2. Comparison of *CYP1A*-EC50 values

229 Using the DRC package of the R program we were able to choose the best
230 models to adjust the *CYP1A* response curves under BNF exposure. For *P. vivipara*, the
231 Weibull type 2 model of four parameters was chosen (modelfit $p=0.63$) and to *P.*
232 *caudimaculatus* the Weibull type 2 of three parameters was chosen (modelfit $p=0.3$)

233 (Table 1). The *CYP1A* induction curves for the *P. vivipara* from P and R populations are
234 showed in Figure 1, while the curves for *P. caudimaculatus* are showed in Figure 2.
235 Fifty percent effective concentrations (EC50) for populations were calculated using the
236 DRC package of the R program through the models chosen for each species (Table 2).
237 The EC50 for *P. vivipara* populations was significantly lower in the fingerlings from R
238 population than in the fingerlings from P population (190.9 and 15905.8 η M,
239 respectively; $p < 0.05$). Based on that statistical EC50 comparison we could conclude that
240 *P. vivipara* fish from P site showed a distinct sensitivity for *CYP1A* induction, in respect
241 to R site, which may represent *CYP1A* refractory response in this fish population. For
242 the case of *P. caudimaculatus* the EC50 values were 220.2 and 265.2 η M BNF for
243 polluted and reference sites, respectively ($p > 0.05$), so statistical EC50 comparison did
244 not indicate the existence of a *CYP1A* refractory phenotype in the guppy population
245 from P site.

246 3.3 Comparison of the maximum level of *CYP1A* to 10,000 η M BNF

247 An interesting trend that was observed from the analysis of dose response curves
248 (Figure 1 and 2) was that populations from R site may reach higher levels of *CYP1A*
249 transcription than populations from P site when exposed to the higher tested
250 concentrations of BNF. Based on that observation, we hypothesize that the *CYP1A*
251 refractory response would be related to a decrease in the ability to reach maximum
252 levels of *CYP1A* induction and decided to test this parameter as an alternative endpoint
253 to identify the *CYP1A* refractory responses in guppies. The level of *CYP1A* expression
254 after exposure to the higher BNF concentration of 10,000 η M was high in population of
255 R site than P site ($p < 0.05$). This was observed for both guppy species. For the R site, the
256 mean values of expression were 0.22 ± 0.06 for *P. vivipara* and 0.39 ± 0.11 for *P.*

257 *caudimaculatus*, while for the population of P site were 0.02 ± 0.01 and 0.17 ± 0.03 ,
258 respectively (Figure 3). This approach allowed to find significant differences between
259 the R and P populations of both species ($p < 0.05$) suggesting the existence of a distinct
260 ability for *CYP1A* induction in *P. vivipara* and *P. caudimaculatus* populations of P sites.

261

262 3.4. The evaluation of *CYP1A* refractory phenotype in guppies

263 This study was able to suggest, for the first time, alternative approaches to
264 compare the adaptive capacities of poeciliid populations from two sites with different
265 history of environmental contamination.

266 The use of the usual endpoint for *CYP1A* refractory phenotype evaluation, by
267 comparing fish exposed to dioxin like compounds and control, is common in studies
268 with North American fishes (Willis et al., 2009; Wills et al., 2010). In the case of South
269 American guppies, the absence of induction of *CYP1A* by exposure to a fixed
270 concentration of BNF compared to control does not appear to be the most appropriate
271 criterion for assessing *CYP1A* related adaptations in fish populations. This approach
272 differentiates the populations of *P. vivipara* from P and R sites in just one of the tested
273 BNF concentrations ($10 \text{ } \mu\text{M}$) and did not differentiates the populations of *P.*
274 *caudimaculatus* from P and R sites. The second approach used, by the comparison of
275 EC_{50} of *CYP1A* response curves for BNF exposure, showed similar results, by
276 evidencing an *CYP1A* refractory response for *P. vivipara* from P site, and did not
277 evidencing this response for *P. caudimaculatus* from P site. Thus, we would suggest the
278 use of the statistical comparison of EC_{50} values using the DRC package of the R
279 program as an promising way to evaluate the existence of *CYP1A* refractory responses
280 in populations of fish adapted to contaminant impacted sites.

281 In addition to the dose response curve analysis approach, the statistical
282 comparison of *CYP1A* expression levels obtained after exposure to 10,000 η M seems to
283 be the best alternative to differentiate the sensitivity of South American fish populations
284 with different historical contamination by PAHs. This approach could be tested isolated
285 or complemented with the analysis of dose response curves and EC50 values compared
286 statistically, providing greater robustness to studies related to CYP1A refractory
287 phenotypes.

288 According to Wirgin and Waldman (2004), the induction resistance of CYP1A
289 seems to be associated with significant costs for the fish species. For example, the
290 killifish *Fundulus heteroclitus* that have adapted or evolved to support PAH pollution
291 consequently have alterations in energy metabolism (Lindberg et al., 2017). The
292 diminished capacity of CYP1A induction observed here for two species of South
293 American guppies populations that inhabit a site historically contaminated with PAHs
294 could have ecological implications for them. Future studies could be carried out, using
295 the approach showed here to identify new populations of wild fish that developed
296 adaptation to pollution and studding the molecular mechanisms involved in those
297 adaptations.

298

299 **Acknowledgements**

300 We thanks to CAPES fellowship support through the agreement of the Coimbra Group
301 of Brazilian Universities and the Organization of the American States, in addition to the
302 PROEX fund of the postgraduate program in Biological Oceanography. This research
303 was supported by the International Foundation for Science, Stockholm, Sweden,

304 through a grant to Juliano Zanette (grant I-2-A-5350-2). J. Zanette is productivity
305 research fellows from CNPq-Brazil.

306

307 **References**

- 308 Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R.,
309 Yunes, J. S., Monserrat, J. M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity
310 against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins
311 toxicity. *Sci. Total Environ.* 407: 2115–23.
- 312 Arzuaga, X., Elskus, A. 2002. Evidence for resistance to benzo[a]pyrene and 3,4,3'4'-
313 tetrachlorobiphenyl in a chronically polluted *Fundulus heteroclitus* population.
314 *Marine Environmental Research* 54, 247–251.
- 315 Bello, S. M., Franks, D. G., Stegeman, J. J., Hahn, M. E. 2001. Acquired resistance to
316 Ah receptor agonists in a population of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*)
317 inhabiting a marine superfund site: in vivo and in vitro studies on the inducibility of
318 xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicological Sciences*, 60(1), 77-91.
- 319 Brown, D. R., Clark, B. W., Garner, L. V. T., Di Giulio, R. T. 2016. Embryonic
320 cardiotoxicity of weak aryl hydrocarbon receptor agonists and *CYP1A* inhibitor
321 fluoranthene in the Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Comparative*
322 *Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 188, 45-51.
- 323 Chivittz, C. C., Pinto, D. P., Ferreira, R. S., Sopezki, M. da S., Fillmann, G., Zanette, J.
324 2016. Responses of the *CYP1A* biomarker in *Jenynsia multidentata* and
325 *Phalloceros caudimaculatus* and evaluation of a *CYP1A* refractory phenotype.
326 *Chemosphere*, 144, 925–931.

- 327 Elskus, A. A., Monosson, E., McElroy, A. E., Stegeman, J. J., Woltering, D. S. 1999.
328 Altered *CYP1A* expression in *Fundulus heteroclitus* adults and larvae: a sign of
329 pollutant resistance?. *Aquatic Toxicology*, 45(2-3), 99-113.
- 330 Ferreira, R. S., Monserrat, J. M., Ferreira, J. L. R., Kalb, A. C., Stegeman, J., Bainy, A.
331 C. D., Zanette, J. 2012. Biomarkers of organic contamination in the South
332 American fish *Poecilia vivipara* and *Jenynsia multidentata*. *Journal of Toxicology*
333 and *Environmental Health, Part A*, 75(16-17), 1023-1034.
- 334 Ferreira, R. S., da Cruz Chivittz, C., dos Santos, G. S., Zanette, J. 2016. Cytochrome
335 P450 1A mRNA in the guppy *Phalloceros caudimaculatus* and response to beta-
336 naphthoflavone and environmental samples. *Aquatic Toxicology*, 181, 86-93.
- 337 Froese, R., and Pauly, D. (Eds.). 2018. FishBase. Electronic publication.
338 www.fishbase.org (accessed October 2018).
- 339 Jung, D., Di Giulio, R. T. 2010. Identification of mitochondrial cytochrome P450
340 induced in response to polycyclic aromatic hydrocarbons in the mummichog
341 (*Fundulus heteroclitus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C:*
342 *Toxicology & Pharmacology*, 151(1), 107-112.
- 343 Karimzadeh, K. 2016. Effects of Beta-Naphthoflavone and 3-Methylcholanthren on
344 Biochemical Markers in Sturgeon Fish, *Huso huso*. *Iranian Journal of Toxicology*
345 Vol, 10(3).
- 346 Lindberg, C. D., Jayasundara, N., Kozal, J. S., Leuthner, T. C., Di Giulio, R. T. 2017.
347 Resistance to polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity and associated bioenergetic
348 consequences in a population of *Fundulus heteroclitus*. *Ecotoxicology*, 26(3), 435-
349 448.

- 350 Lucinda, P.H.F., 2008. Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros*
351 Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae), with the
352 description of twenty-one new species. *Neotropical Ichthyology*. 6 (2), 113-158.
- 353 Medeiros, P.M., Bicego, M.C., Castelao, R.M., Rosso, C.D., Fillmann, G., Zamboni,
354 A.J., 2005. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos
355 Lagoon Estuary, Brazil. *Environ. Int.* 31, 77-87.
- 356 Meyer, J.N., Nacci, D.E., Di Giulio, R.T., 2002. Cytochrome P4501A (*CYP1A*) in
357 killifish (*Fundulus heteroclitus*): heritability of altered expression and relationship
358 to survival in contaminated sediments. *Toxicol. Sci.* 68, 69–81.
- 359 Nacci, D. E., Kohan, M., Pelletier, M., George, E. 2002. Effects of benzo [a] pyrene
360 exposure on a fish population resistant to the toxic effects of dioxin-like
361 compounds. *Aquatic Toxicology*, 57(4), 203-215.
- 362 Nacci, D.E., Champlin, D., Jayaraman, S. 2010. Adaptation of the Estuarine Fish
363 *Fundulus heteroclitus* (Atlantic Killifish) to Polychlorinated Biphenyls (PCBs).
364 *Estuaries and Coasts* 33, 853-864.
- 365 Ownby, D.R., Newman, M.C., Mulvey, M., Vogelbein, W.K., Unger, M.A., Arzayus,
366 L.F., 2002. Fish (*Fundulus heteroclitus*) populations with different exposure
367 histories differ in tolerance of creosote-contaminated sediments. *Environ. Toxicol.*
368 *Chem.* 21, 1897–1902.
- 369 Oziolor, E. M., Bigorgne, E., Aguilar, L., Usenko, S., Matson, C. W., 2014. Evolved
370 resistance to PCB-and PAH-induced cardiac teratogenesis, and reduced *CYP1A*
371 activity in Gulf killifish (*Fundulus grandis*) populations from the Houston Ship
372 Channel, Texas. *Aquatic Toxicology*, 150, 210-219.

- 373 Pinto, D.P., Chivittz, C.C., Ferreira, R.S., Sopezki, M.S., Zanette, J., 2015. Beta-
374 naphthoflavone-induced *CYP1A* expression in the guppy *Jenynsia multidentata*:
375 time-dependent response, anesthetic MS-222 effect and fin analysis. *Ecotoxicol.*
376 *Environ. Saf.* 113, 38–44
- 377 Powell, W. H., Morrison, H. G., Weil, E. J., Karchner, S. I., Sogin, M. L., Stegeman, J.
378 J., Hahn, M. E. 2004. Cloning and analysis of the *CYP1A* promoter from the
379 atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Marine environmental research*, 58(2-5),
380 119-124.
- 381 Ritz C, Streibig JC. 2005. Bioassay Analysis using R. *J Stat Softw.* 12:1–22
- 382 Ritz C. Towards a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology.
383 *Environ Toxicol Chem.* 2010; 29:220–229
- 384 Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. 2015. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS*
385 *ONE* 10(12): e0146021.
- 386 Roling, J. A., Bain, L. J., Baldwin, W. S. 2004. Differential gene expression in
387 mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) following treatment with pyrene: comparison
388 to a creosote contaminated site. *Marine environmental research*, 57(5), 377-395.
- 389 Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative
390 CT method. *Nat. Protoc.* 3 (6), 1101–1108.
- 391 Wang, L., Camus, A. C., Dong, W., Thornton, C., Willett, K. L. 2010. Expression of
392 *CYP1C1* and *CYP1A* in *Fundulus heteroclitus* during PAH-induced carcinogenesis.
393 *Aquatic toxicology*, 99(4), 439-447.
- 394 Wassenberg, D. M., Di Giulio, R. T. 2004. Teratogenesis in *Fundulus heteroclitus*
395 embryos exposed to a creosote-contaminated sediment extract and *CYP1A*
396 inhibitors. *Marine environmental research*, 58(2-5), 163-168.

- 397 Williams, R., Hubberstey, A. V. 2014. Benzo (a) pyrene exposure causes adaptive
398 changes in p53 and *CYP1A* gene expression in Brown bullhead (*Ameiurus*
399 *nebulosus*). *Aquatic toxicology*, 156, 201-210.
- 400 Wills, L. P., Zhu, S., Willett, K. L., Di Giulio, R. T. 2009. Effect of *CYP1A* inhibition
401 on the biotransformation of benzo [a] pyrene in two populations of *Fundulus*
402 *heteroclitus* with different exposure histories. *Aquatic toxicology*, 92(3), 195-201.
- 403 Wills, L.P., Matson, C.W., Landon, C.D., Di Giulio, R.T. 2010. Characterization of the
404 recalcitrant CYP1 phenotype found in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*)
405 inhabiting a superfund site on the Elizabeth River, VA. *Aquat. Toxicol.* 99, 33e41.
- 406 Wirgin I, Waldman JR. 2004. Resistance to contaminants in North American fish
407 populations. *Mutat Res.* 2004; 552:73–100.
- 408 Wirgin, I., Roy, N. K., Loftus, M., Chambers, R. C., Franks, D. G., Hahn, M. E. 2011.
409 Mechanistic basis of resistance to PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River.
410 *Science*, 331(6022), 1322-1325.
- 411 Wojdylo, J. V., Vogelbein, W., Bain, L. J., Rice, C. D. 2016. AHR-related activities in a
412 creosote-adapted population of adult atlantic killifish, *Fundulus heteroclitus*, two
413 decades post-EPA superfund status at the Atlantic Wood Site, Portsmouth, VA
414 USA. *Aquatic Toxicology*, 177, 74-85.
- 415 Yuan, Z., Wirgin, M., Courtenay, S., Ikonomou, M., Wirgin, I. 2001. Is hepatic
416 cytochrome P4501A1 expression predictive of hepatic burdens of dioxins, furans,
417 and PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River estuary?. *Aquatic Toxicology*,
418 54(3-4), 217-230.

419 Yuan, Z., Courtenay, S., Chambers, R. C., Wirgin, I. 2006. Evidence of Spatially
420 Extensive Resistance to PCBs in an Anadromous Fish of the Hudson River.
421 Environmental Health Perspectives, 114(1), 77–84.
422