

Potencial toxicogenômico do contaminante ambiental
2-fenilbenzotriazol 9 não clorado (*non-Cl* PBTA-9) *in vivo*

Amanda Rodrigues Tanamachi

Botucatu - SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Potencial toxicogenômico do contaminante ambiental
2-fenilbenzotriazol 9 não clorado (*non-Cl PBTA-9*) *in vivo*

Amanda Rodrigues Tanamachi

Orientadora: Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientador: Dr. Fábio Henrique Fernandes

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu - SP

2020

T161p

Tanamachi, Amanda Rodrigues

Potencial toxicogenômico do contaminante ambiental
2-fenilbenzotriazol 9 não clorado (non-Cl PBTA-9) in vivo /
Amanda Rodrigues Tanamachi. -- Botucatu, 2020

56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientadora: Fábio Henrique Fernandes

1. Toxicologia ambiental. 2. Mutagenese. 3. Genética. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, Silvana e Eyiji Tanamachi por todo apoio, incentivo, paciência e compreensão da minha ausência em momentos importantes durante esses anos, sem o amor incondicional deles eu não chegaria até onde cheguei. Ao meu irmão Vitor Rodrigues Tanamachi, por todo o amparo, amizade e suporte técnico, que com toda certeza foi fundamental.

Amo muito vocês!

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, pela oportunidade e confiança depositada. Graças as motivações e ensinamentos, consegui superar obstáculos e continuar a caminhada para me tornar uma pesquisadora.

Ao meu coorientador, Dr. Fábio Henrique Fernandes, pela amizade, incentivo e paciência. Obrigada por me mostrar sempre o lado positivo nos momentos difíceis e pela fiel dedicação, extremamente importante para minha formação.

À MSc. Josiane Aparecida de Souza Vendemiatti (FT–Unicamp) pela primordial colaboração, confiança e por compartilhar seu conhecimento sobre o PBTA-9, assim como o fornecimento do composto-teste.

À Dra. Patrícia Prediger (FT–Unicamp) pela parceria fundamental e por acreditar no potencial da pesquisa.

À Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro (FT–Unicamp) pelo apoio ao trabalho e pela contribuição de conhecimento.

À Dra. Noeme Sousa Rocha (FMVZ–Unesp) pela interpretação das análises histopatológicas do fígado e por toda gentil colaboração.

Aos técnicos do biotério do Departamento de Patologia (FMB–Unesp), Paulo César Georgete, José Roberto de Oliveira e Rosangela de Campos, pelo importante apoio e suporte com os animais.

Aos assessores estatísticos do Escritório de Apoio à Pesquisa (FMB–Unesp), Dr. Hélio Rubens de Carvalho Nunes e MSc. Eloisa Elena Paschoalinotte, pelo processamento de dados estatístico dos testes do Cometa e Micronúcleo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado pelo processo n° 2018/04105-5.

Ao Instituto Nacional de Tecnologias Alternativas para Detecção, Avaliação Toxicológica e Remoção de Micropoluentes e Radioativos (INCT-DATREM) pelo incentivo financeiro concedido pela chamada INCT – MCTI/ CNPq/CAPES/FAPs n° 16/2014.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) da Unesp – Botucatu, em especial ao Supervisor Técnico da Seção de Pós-Graduação Davi Barcellos de Oliveira Müller por sempre sanar minhas dúvidas com competência e agilidade.

Aos meus colegas, membros do Laboratório de Toxicogenômica & Nutrigenômica (OMICS) e do Laboratório Genotox, Dr. André Luiz Ventura Sávio, Dr. Leonardo da Cunha Menezes Souza, Dra. Juliana Lara, Phillippe Franklin Coelho Magalhães e Kamilla Leme, por todo companheirismo e valiosa amizade, além da extrema cooperação com o trabalho. Agradeço muito pelos ensinamentos, afetos e carinhos, imensamente importantes para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

E a todos meus familiares e amigos que de alguma forma me proporcionaram força, tranquilidade e sabedoria para meu crescimento e a realização deste estudo.

Muito Obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Sumário

Índice de Tabelas	I
Índice de Figuras	II
Lista de Abreviaturas e Siglas	III
Resumo	IV
Abstract.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1. Poluição ambiental e efluentes têxteis.....	8
2.2. Corantes azo e a formação de non-Cl PBTAs	9
2.3 Atividade mutagênica de corantes azo e seus derivados	13
2.4 Testes para avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade.....	15
2.5. Modulação gênica e a gênese de doenças.....	19
3. HIPÓTESE DO ESTUDO.....	21
4. OBJETIVOS	22
4.1 Geral	22
4.2 Específicos.....	22
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.1. Animais.....	23
5.2 Composto-teste	23
5.3 Delineamento experimental	24
5.4 Teste do micronúcleo.....	25
5.5 Teste do cometa	26
5.5.1 Obtenção de células	26
5.5.2 Preparação de lâminas, eletroforese e análise microscópica	27
5.6 Análise de expressão gênica em células hepáticas	29
5.6.1 Extração e quantificação de RNA	29
5.6.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT).....	29
5.7 Análise histopatológica	30

6. RESULTADOS	32
6.1 Teste do micronúcleo.....	32
6.2 Teste do cometa	33
6.3 Análise de expressão gênica	34
6.4 Histologia do fígado	35
7. DISCUSSÃO	36
8. CONCLUSÃO.....	40
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
10. ANEXO I.....	46

Índice de Tabelas

Tabela 1. Estrutura e nome químico de oito tipos de 2-fenilbenzotriazóis não clorados (<i>non</i> -Cl PBTA) descritos na literatura (modificado de Carmazen, 2007; Kummrow & Umbuzeiro, 2008).....	11
Tabela 2: Bateria de testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> recomendada pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) para avaliação de potencial toxicogenético	16
Tabela 3: Nomenclatura e informações complementares das sondas utilizadas na avaliação toxicogenômica do <i>non</i> -Cl PBTA-9	30
Tabela 4: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos tratados com o <i>non</i> -Cl PBTA-9	32

Índice de Figuras

Figura 1. Via simplificada de síntese dos 2-fenilbenzotriazóis não clorados (non-Cl PBTA) a partir de um corante azoico (modificado de Carmazen, 2007).....	10
Figura 2. Estrutura química do PBTA-9 não clorado.....	12
Figura 3. Fotomicrografia de células submetidas a eletroforese (teste do cometa). (A) Nucleóide íntegro – cabeça; (B) nucleóide e a cauda formada por fragmentos de DNA, conferindo aspecto de cometa.....	18
Figura 4. Esquema mostrando o processo de divisão eritrocitária e formação de micronúcleos em medula óssea de roedores. (A) Dano de origem clastogênica; (B) dano de origem aneugênica. Adaptado de MutaGen – Brasil; www.youtube.com/watch?v=rFO7Mn4O1As..	18
Figura 5. Fotomicrografia de esfregaço de medula óssea de camundongo. A; eritrócito policromático. B; eritrócito normocromático. C; eritrócito policromático micronucleado. Coloração Giemsa; aumento de 1000x.....	26
Figura 6. Fotomicrografia de células sanguíneas de camundongos coradas com solução aquosa de SYBR Gold (1:9999). (A) Quantificação da porcentagem de DNA fragmentado na cauda do nucleóide (% tail intensity) pelo software Comet Assay IV. Aumento de 400x; *nucleóides.....	28
Figura 7. Danos no DNA (tail intensity) de células do sangue periférico, fígado e cólon de camundongos tratados com o <i>non-Cl</i> PBTA-9. Controle positivo (MNU 50 mg/kg p.c.); controle negativo – água filtrada; controle do veículo de dissolução (0,5% DMSO); * $p < 0,001$ em relação ao controle do veículo (DMSO).....	33
Figura 8. Expressão relativa de RNAm <i>NAT2</i> , <i>TRP53</i> , <i>CYP1A1</i> e <i>CDKN1A</i> em células hepáticas de camundongos tratados com <i>non-Cl</i> PBTA-9 (5, 50 e 500µg/kg p.c.). Controle negativo (água filtrada); controle do veículo de dissolução (0,5% DMSO).	34
Figura 9. Fotomicrografias de fígado de camundongos. A – controle positivo; B – controle do veículo de dissolução (0,5% DMSO); C – grupo tratado com 5µg/kg do <i>non-Cl</i> PBTA-9; D – grupo tratado com 50µg/kg p.c. do <i>non-Cl</i> PBTA-9; E – grupo tratado com 500µg/kg p.c. do <i>non-Cl</i> PBTA-9. As setas indicam células binucleadas. Coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400x.....	35

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
BDCP	<i>Black Dye Commercial Product</i>
CI	<i>Color index</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CDKN1A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A (P21)</i>
CYP1A1	<i>Cytochrome P450, Family 1, Subfamily A, Polypeptide 1</i>
CYP450	<i>Cytochromes P450</i>
DB291	Disperse Blue 291
DB373	Disperse Blue 373
DMSO	Dimetilssulfóxido
DO37	Disperse Orange 37
DR1	Disperse Red 1
DV93	Disperse Violet 93
ETA	Estação de tratamento de Água
IDN	Índice de Divisão Nuclear
IPBC	Índice de Proliferação do Bloqueio de Citocinese
MNU	<i>N-methyl-N-nitrosourea</i>
NAT2	<i>N-acetyltransferase 2</i>
NCE	Eritrócitos normocromáticos (do inglês <i>normochromatic erythrocytes</i>)
Non-Cl PBTA-9	2-fenilbenzotriazol 9 não clorado (do inglês <i>2-phenylbenzotriazole non chlorinated</i>)
OECD	<i>Organization Economic Co-operation and Development</i>
PBTA	2-fenilbenzotriazol (do inglês <i>2-phenylbenzotriazole</i>)
PCE	Eritrócitos policromáticos (do inglês <i>polychromatic erythrocytes</i>)
PCEMN	Eritrócitos policromáticos micronucleados
TRP53	<i>Transformation Related Protein 53</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro

Resumo

O setor industrial, em constante expansão, gera, diariamente, resíduos com elevado potencial tóxico ao ambiente. Nesse contexto, a indústria têxtil apresenta grande impacto poluidor para a hidrosfera, devido aos compostos e processos químicos utilizados na coloração de tecidos. A literatura mostra que não há eficiência na remoção desses compostos, tanto por parte das fábricas, como em Estações de Tratamento de Água (ETAs) para o abastecimento humano. Pelo contrário, o processo de descontaminação pode tornar corantes do grupo azo, por exemplo, ainda mais tóxicos. Portanto, a poluição ambiental por essa classe de corantes vem sendo alvo de inúmeros estudos para a caracterização química e toxicológica, sobretudo dos subprodutos e intermediários gerados, dentre os quais os 2-fenilbenzotriazolóis não clorados (*non-Cl* PBTA). Dentre eles, o *non-Cl* PBTA-9 tem recebido especial atenção por ser derivado do corante Disperse Violet 93, que tem sido detectado em maior quantidade nos corpos fluviais sob influência de atividades têxteis. Com base nesse cenário, o presente estudo objetivou investigar o potencial toxicogenômico do *non-Cl* PBTA-9 em camundongos. Foram testadas três concentrações do composto, 5, 50 e 500 µg/kg p.c., administradas aos animais por via gástrica (*gavage*) em dose única. Foram analisadas as frequências de micronúcleo em células de medula óssea, o nível de danos primários no DNA em células do sangue, fígado e cólon, além do padrão de expressão dos genes *TP53*, *CYP1A1*, *NAT2* e *CDKN1A* e histologia do fígado. Os resultados mostraram que o *non-Cl* PBTA-9 apresentou efeito genotóxico em células do sangue periférico e do fígado na dose de 500 µg/kg p.c, além de ser genotóxico nas doses de 5, 50 e 500 µg/kg em células do cólon. O efeito mutagênico em células da medula óssea foi observado apenas nas doses de 5 e 50 µg/kg p.c e não foi encontrada nenhuma alteração histológica e na expressão gênica no fígado. Diante desses achados pode-se concluir que o *non-Cl*-PBTA-9, subproduto do corante azo DV93, mesmo em baixas concentrações, foi genotóxico e mutagênico, sugerindo que a contaminação da água por esse composto pode ser prejudicial ao meio ambiente e à saúde humana.

Palavras-chaves: *corante têxtil, 2-fenilbenzotriazol, poluição hídrica, mutagênese ambiental*

Abstract

The constantly expanding industrial sector has been generating residues with high toxic potential to the environment. The textile industry has a heavily impact, polluting the hydrosphere due to chemical processes used. Literature shows that even after effluent treatment, toxic compounds are still present in the wastewater and in rivers. Moreover, the water decontamination can make some dyes compounds even more toxics. Currently, environmental pollution caused by azo dyes, their byproducts and intermediates, has been widely investigated. In this sense, the non-chlorinated 2-phenylbenzotriazole 9 (*non-Cl* PBTA 9) has received attention because it is derived from the dye Disperse Violet 93, which is detected in high quantity in surface waters under influence of textile activities. Thus, the aim of this study was to investigate the toxicogenomic potential of acute exposure to the non-chlorinated PBTA-9 in mice. The three doses tested (5, 50 and 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) of the compound were orally (gavage) administered to the animals. Micronucleus frequency in bone marrow cells, primary DNA damage in blood, liver and colon cells, and gene (*TP53*, *CYP1A1*, *NAT2* and *CDKN1A*) expression profiling in liver cells were analyzed. The results showed that the *non-Cl* PBTA 9 was genotoxic in blood and liver cells at the highest dose (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.) and at doses of 5, 50 and 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. in colon cells. Mutagenic effect in bone marrow cells was observed at 5 and 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.. No histological alterations and gene expression modulation were detected in liver. In conclusion, the data showed that the *non-Cl* PBTA 9, byproduct of DV93, even at low concentrations, presented a genotoxic potential, suggesting that water contamination by this compound may be harmful to the environment and human health.

Keywords: Environmental Mutagenesis, 2-phenylbenzotriazole, Textile Dye, Water Pollution

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

Ao contrário do que se pensava no passado, os recursos hídricos são limitados, sobretudo no que se refere a água para o consumo humano (Ghaly et al., 2013). O aumento e o uso irracional da atividade industrial fazem com que a poluição dos recursos hídricos seja um dos maiores e mais relevantes problemas do mundo moderno. A utilização inadequada da água resulta em impactos para o meio ambiente, como o acúmulo de substâncias tóxicas, eutrofização, poluição térmica, entre outros, cujas agressões podem se tornar irreversíveis (Subtil et al., 2014).

Estudos recentes demonstram que, em alguns casos, o problema da contaminação de recursos hídricos piorou no decorrer dos anos. De 1998 a 2008, foram coletadas 1.720 amostras de água de diferentes rios do Estado de São Paulo, e as análises mostraram que 20% apresentavam potencial mutagênico detectado pelo teste de *Salmonella*/Microsoma (Teste de Ames). Nos períodos de 1999 a 2003 e 2011 a 2015, utilizando o mesmo teste, foram analisadas amostras 33 locais e observado aumento da mutagenicidade. Esse fato, de acordo com os autores, provavelmente causado pelo aumento de atividade industrial (foram registradas 7.000 novas licenças de funcionamento por ano), além do crescimento populacional. Importante destacar que nesse estudo os pesquisadores selecionaram os locais de coleta de acordo com o destino que se dava à água do rio, dando preferência a rios cuja água era utilizada para consumo humano (como água para beber, recreação e banho) e navegação (Roubicek et al., 2020).

O lançamento de efluentes industriais é a forma mais comum de contaminação de corpos fluviais, uma vez que normalmente não são utilizados processos de produção completamente limpos. Nesse sentido, o setor têxtil brasileiro, que hoje representa 2,6% da produção mundial, contribui consideravelmente para a geração de grandes quantidades de

poluentes ambientais (Amaral et al., 2018). Os efluentes das indústrias têxteis são caracterizados por possuírem elevada complexidade, contendo inúmeros compostos comprovadamente mutagênicos (metais pesados, surfactantes, subprodutos de processamentos, corantes dispersos da classe azo, entre outros) (Schmidt, 2018). Recentemente, estudo realizado por Vendemiatti *et al.* (2017) mostrou que o tratamento inadequado dos efluentes pode produzir reações oxidativas e/ou redutivas envolvendo os corantes da classe azo e gerar subprodutos ainda mais tóxicos.

No campo do monitoramento ambiental existe a busca constante por condições adequadas à manutenção dos ecossistemas e da saúde humana. Assim, a área de Mutagênese Ambiental tornou-se de extrema relevância, pois produz conhecimentos sobre o perigo genético da exposição às mais variadas classes de poluentes. Embora os organismos vivos possuam sistemas de defesa bastante eficientes, a identificação de compostos mutagênicos e de situações de exposição a esses agentes pode evitar ou reduzir a chance do desenvolvimento de diversas doenças, entre as quais o câncer. Hoje, são inúmeras as ferramentas que permitem detectar atividades mutagênicas utilizando-se diferentes sistemas-teste e protocolos de pesquisa. É possível, por exemplo, identificar mutágenos presentes no ar, solo e água, além dos seus respectivos mecanismos de ação genotóxica.

Dentro do contexto apresentado, vários países têm direcionado esforços no sentido de aprimorar as estratégias de monitoramento ambiental e formar massa crítica para avaliações de risco e implementação de soluções para as situações adversas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Poluição ambiental e efluentes têxteis*

Com o desenvolvimento agrícola e industrial, tem se tornado tarefa cada vez mais difícil satisfazer as demandas relativas ao consumo de água. As indústrias têxteis são as responsáveis por 15% do consumo industrial de água, produzindo efluentes com elevada carga orgânica, uma vez que o aproveitamento de insumos é baixo (Kunz et al., 2002). Assim sendo, e considerando o alto volume de efluente gerado, as indústrias têxteis são consideradas como sendo de alto potencial poluidor, devido à variabilidade de suas características e quantidade de produtos descartados (Ghaly et al., 2013). Dentre os principais compostos químicos encontrados em efluentes da indústria têxtil estão aqueles de natureza sintética, macromoléculas orgânicas e materiais não biodegradáveis, detergentes, soda, óleos e graxas, além de resíduos de elevada complexidade e de difícil descontaminação por tratamento da água (Rodríguez et al., 1999; Rauf & Salman Ashraf, 2012).

Atualmente, a legislação brasileira não estabelece parâmetros colorimétricos claros para o lançamento de efluentes no ambiente. Há, apenas, determinação para que o efluente não altere a cor do corpo receptor (CONAMA, 2011). Deste modo, produtos aplicados para remoção de cor do efluente são amplamente utilizados com a finalidade de se adequar aos padrões estabelecidos para o despejo industrial. A prática de cloração é bastante empregada para tratar efluentes de indústrias têxteis, porém foi demonstrado que esse método pode gerar compostos mutagênicos acromáticos que são encontrados tanto em água bruta quanto tratada (Umbuzeiro et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Umbuzeiro et al., 2007). De fato, estudos realizados por Umbuzeiro *et al.* (2005; 2007) e Oliveira *et al.* (2006), nos quais foi analisada a qualidade da água tratada de um rio da região metropolitana de São Paulo que serve como fonte de abastecimento humano para a região, foi detectada a presença de corantes do tipo azo

e de seus derivados 2-fenilbenzotriazóis não clorados (*non-Cl* PBTAs), ambos com atividade mutagênica.

2.2. Corantes azo e a formação de *non-Cl* PBTAs

Os corantes dispersos da classe azo são os mais utilizados pelo setor têxtil, representando mais de 50% do total comercializado no mundo. Isto se deve às suas particularidades químicas, dentre as quais a característica estrutural que possibilita a formação de diversas estruturas e uma variedade de cores. A estrutura química é considerada simples, apresentando pelo menos uma ligação azo e a presença de um cromóforo (N=N), com capacidade de coloração cerca de 2 a 3 vezes maior que a de outras classes de corantes, como os antraquinônicos e o estirilo. Os corantes azoicos apresentam baixa solubilidade em água, sendo necessária a utilização de agentes dispersantes para o tingimento de fibras hidrofóbicas, como as de poliéster, *nylon* e acetato de celulose. Após o processo de tingimento, cerca de 1% a 5% do corante residual continuam no banho aquoso, gerando um efluente de difícil tratamento (Guaratini & Zanoni, 2000; Umbuzeiro et al., 2005).

Os *non-Cl* PBTAs são subprodutos gerados por um precursor azoico durante a etapa de tingimento na indústria têxtil, ou durante o tratamento do efluente, na etapa de descoloração. De modo geral, a síntese dos *non-Cl* PBTAs inicia-se quando o corante sofre redução do grupamento azo gerando hidrazina, que posteriormente reage com nitrogênio resultando um composto *N*-óxido. Este, após redução, transforma-se em NO₂, gerando o PBTA não clorado (Figura 1). Na Tabela 1, são apresentados os oito tipos de *non-Cl* PBTAs descritos na literatura (Kummrow & Umbuzeiro, 2008).

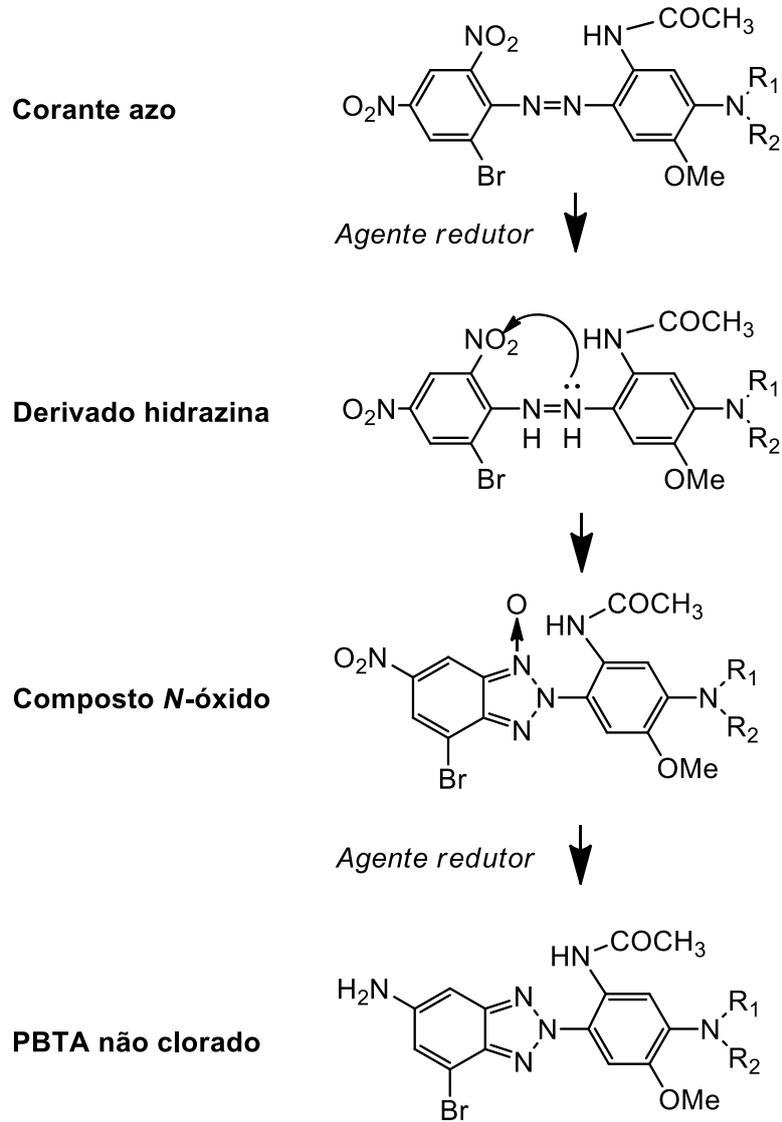
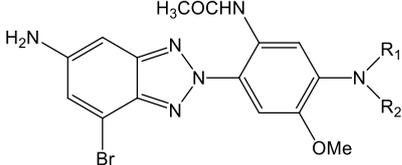


Figura 1. Via simplificada de síntese dos 2-fenilbenzotriazóis não clorados (*non*-Cl PBTAs) a partir de um corante azoico (modificado de Carmazen, 2007).

Tabela 1. Estrutura e nome químico de oito tipos de 2-fenilbenzotriazóis não clorados (*non-Cl* PBTA) descritos na literatura (modificado de Carmazen, 2007; Kummrow & Umbuzeiro, 2008)

Estrutura Química	<i>Non-Cl</i> PBTA	R ₁ e R ₂	Nomenclatura
	1	R ₁ : C ₂ H ₄ OCH ₃ R ₂ : C ₂ H ₄ OCH ₃	2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-metoxietil) amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> benzotriazol
	2	R ₁ : C ₂ H ₄ CN R ₂ : C ₂ H ₅	2-[2-(acetilamino)-4-[<i>N</i> -(2cianoetil)etilamino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol.
	3	R ₁ : C ₂ H ₄ OH R ₂ : H	2-[2-(acetilamino)-4-[(2-hidroxi)etil]-amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol
	4	R ₁ : H R ₂ : H	2-(2-(acetilamino)-4-amino-5-metoxifenil)-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol
	5	R ₁ : C ₂ H ₄ OCOCH ₃ R ₂ : C ₂ H ₄ OCOCH ₃	2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-acetoxietil)amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol
	6	R ₁ : C ₂ H ₄ OH R ₂ : C ₂ H ₄ OH	2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-hidroxi)etil]amino]-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol
	7	R ₁ : CH ₂ CH ₃ R ₂ : CH ₂ CH ₃	2-[2-(acetilamino)-4-(dietilamino)-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol
	8	R ₁ : CH ₂ CHCH ₂ R ₂ : CH ₂ CHCH ₂	2-[2-(acetilamino)-4-(dialilamino)-5-metoxifenil]-6-amino-4-bromo-2 <i>H</i> -benzotriazol

De modo geral, a síntese de todos os PBTAs não clorados descritos na literatura, ocorre por reações sucessivas de redução do corante azoico precursor, gerando o PBTA não clorado. Porém, após a formação do PBTA não clorado (*non*-Cl PBTA) pode suceder reações de cloração, na qual ocorre a geração do PBTA clorado (PBTA) (Kummrow & Umbuzeiro, 2008). De acordo com Matsuoka *et al.* (2001), os PBTAs clorados e não clorados teriam efeitos semelhantes em razão ao esqueleto fenilbenzotriazol análogo a classe de compostos.

Atualmente, novo composto da classe *non*-Cl PBTA, derivado do corante C.I. Disperse Violet 93, está sendo caracterizado, acrescentando, assim, um novo *non*-Cl PBTA à lista de subprodutos existentes (Figura 2). Este novo composto foi encontrado em amostras ambientais e está sendo sintetizado a partir de processos de redução do corante C.I. Disperse Violet 93, também encontrado nos rios brasileiros. Recentemente, o PBTA-9 não clorado foi testado utilizando-se o ágar de microplaca, MPA (versão modificada do ensaio de mutagenicidade de Salmonella/microsossoma com a linhagem YG1041), e foi detectada menor atividade mutagênica quando comparado ao corante original (Vendemiatti *et al.*, 2017; Vacchi *et al.*, 2017).

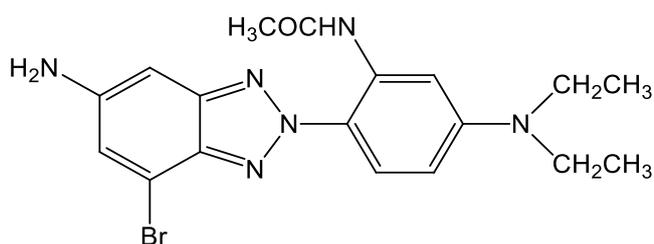


Figura 2. Estrutura química do PBTA-9 não clorado.

Conforme descrito anteriormente, a origem das estruturas químicas dos *non*-Cl PBTAs está ligada aos corantes utilizados em processos de tingimento. No entanto, sua formação no ambiente e sua presença em corpos d'água não estão, ainda, totalmente elucidadas. Alguns

estudos de síntese apontam que a formação do PBTA pode ocorrer em dois momentos distintos: (i) durante as etapas de tingimento, a partir da reação entre o corante azo e agentes químicos redutores utilizados para a eliminação do excesso de corante não impregnado na fibra do tecido; (ii) e na estação de tratamento, durante a etapa de tratamento do efluente têxtil, quando os corantes azo são submetidos a reduções por hidrossulfito de sódio, por exemplo, e então são formados os intermediários (PBTAs não clorados) e, posteriormente, no ambiente e/ou nas estações de tratamento de água, após sucessivas etapas de cloração com ácido hipoclorídico, gerando o PBTA clorado. A redução do corante azo resulta na perda do grupo cromóforo e de sua cor original (Shiozawa et al., 1999; Ohe et al., 2004; Oliveira et al., 2006; Kummrow & Umbuzeiro, 2008; Vendemiatti et al., 2017).

2.3 Atividade mutagênica de corantes azo e seus derivados

Vários estudos foram realizados para avaliar o potencial mutagênico de diversos azo corantes utilizados na indústria têxtil e descartados em rios por meio de seus efluentes. Analisando amostras de água do Ribeirão dos Cristais (Região metropolitana de São Paulo), nas quais foram identificados os corantes CI Disperse Blue 373, CI Disperse Violet 93 e CI Disperse Orange 37, Alves de Lima *et al.* (2007) detectaram potencial mutagênico (*Salmonella typhimurium* linhagens TA98 e YG1041) e carcinogênico (foco de criptas aberrantes em colon de ratos Wistar). Por outro lado, estudos com os compostos corantes obtidos comercialmente mostraram, por exemplo, que o *Black Dye Commercial Product (BDGP)*, que é constituído por três corantes azo, o Disperse Violet 93, Disperse Orange 37 e Disperse Blue 373, e um dos mais utilizados na atividade têxtil, também apresentou efeito mutagênico pelo teste de *Salmonella*/microssoma com as linhagens TA98 (expressão reduzida de nitrorredutase) e YG1041 (expressão aumentada de nitrorredutase e *o*-acetiltransferase), com e sem indução enzimática (S9). Os resultados mostraram, ainda, que a atividade mutagênica

do BDCP na linhagem YG1041 foi aproximadamente 20 vezes superior à observada na TA98, sugerindo que as enzimas nitrorredutase e *o*-acetiltransferase desempenham papel fundamental na mutagenicidade do composto. Outro dado importante desse estudo foi o aumento de mutações induzidas também pelos componentes isolados do BDCP (Disperse Violet 93, Disperse Orange 37 e Disperse Blue 373) (Umbuzeiro et al., 2005).

Outro corante azo que também teve seu potencial mutagênico investigado foi o Disperse Red 1 (DR1). Este composto induziu aumento de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico e em células de hepatoma humano (HepG2) (Chequer et al., 2009). Além disso, foi observado que o DR1 foi capaz de causar alterações morfológicas no desenvolvimento de planárias (*Girardia tigrina*), como movimentos descoordenados, torções irregulares, alteração na cor, aumento de produção de muco e atrasos regenerativos (Ribeiro & Umbuzeiro, 2014). Da mesma forma, foi observado que o DR1 induziu aumento de danos no DNA de células testiculares e da frequência de espermatozoides anormais com consequente comprometimento à saúde reprodutiva de camundongos (Fernandes et al., 2015). Também em estudo *in vivo* com camundongos expostos por via gástrica (*gavage*) ao DR1, Fernandes *et al.* (2018) observaram aumento da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) em células da medula óssea, de danos primários no DNA de células hepáticas, além da modulação de genes envolvidos na regulação do processo inflamatório (*IL1B*) e controle do ciclo celular (*CDKN1A*) em células hepáticas e de genes relacionados à regulação de apoptose em leucócitos (*BCL2* e *BAX*).

O potencial toxicogenético do Disperse Blue 291 foi também detectado pelos testes de Ames, do micronúcleo e do cometa (danos primários no DNA) em linhagens de *Salmonella thyphimurium* e HepG2 (Umbuzeiro et al., 2005; Tsuboy et al., 2007). *In vivo*, Fernandes et al. (2019) observaram aumento da frequência de PCEMN em camundongos tratados com amostras do corante.

Com relação aos PBTAs, estudos realizados *in vitro*, utilizando várias linhagens de *Salmonella thyphimurium*, mostraram elevada atividade mutagênica de PBTAs clorados e não clorados (Shiozawa et al., 1999; Shiozawa et al., 2000; Nukaya et al., 2001; Watanabe, 2002; Watanabe et al., 2006). Cabe destacar que a linhagem mais sensível foi a YG1024, fato que novamente sugere o importante papel das enzimas nitrorredutase e *o*-acetiltransferase para a mutagenicidade dos compostos.

2.4 Testes para avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade

Danos no genoma podem decorrer de mutações espontâneas ou induzidas, em ambientes com ou sem a presença de mutágenos. As mutações espontâneas acontecem em taxas muito baixas, devido ao eficiente sistema de reparo do DNA presente nas células. Porém, os organismos vivos estão frequentemente expostos a agentes nocivos que podem induzir aumentos significativos nas taxas de mutações no DNA, as quais podem desencadear uma série de anomalias nos indivíduos expostos e, ainda, serem transmitidas às gerações seguintes, causando danos à prole (Ferguson et al., 2015).

Até os dias de hoje, os danos induzidos por agentes físicos (ex: radiação), químicos e biológicos (ex: *Helicobacter pylori*) no material genético de células somáticas têm recebido maior atenção devido ao efeito imediato no organismo. De fato, as baterias de testes recomendados para a avaliação de potencial mutagênico determinam que, inicialmente, sejam utilizados células e tecidos somáticos, tanto *in vitro* como *in vivo*. A Tabela 2 mostra a bateria de testes recomendada pela *The Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) e hoje seguida por vários países do mundo para o registro de novos produtos. Geralmente, as baterias de testes de mutagenicidade incluem aqueles para detectar mutações gênicas e cromossômicas (estruturais e numéricas), em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, mais recentemente, maior estímulo tem sido direcionado ao uso apenas de testes *in vitro*.

Tabela 2: Bateria de testes *in vitro* e *in vivo* recomendada pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) para avaliação de potencial toxicogenético

Testes de Mutagenicidade

1. *In vitro*

1.1 - *Mutações gênicas*

Teste de Mutação Reversa em bactérias (*Salmonella typhimurium*)

Testes de Mutação Gênica (*Hprt*, *xprt* ou *TK*) em células de mamífero (CHO, V79 etc)

1.2 - *Mutações cromossômicas*

Teste de Aberração Cromossômica em células de mamíferos (CHO, V79 etc)

Teste do Micronúcleo em células de mamíferos (com bloqueio da citocinese)

2. *In vivo*

2.1 - *Mutações gênicas*

Mutação Gênica em células somáticas e germinativas de roedores transgênicos (MutaTMMouse, BigBlue®)

2.2 - *Mutações cromossômicas*

Teste do Micronúcleo em eritrócitos de mamíferos

Teste de Aberração Cromossômica em medula óssea de mamíferos

Teste do Dominate Letal em roedores

Teste de Aberração Cromossômica em espermatogônias de mamíferos

Ensaio de Translocação Herdável em ratos

Testes de Genotoxicidade

1. *In vivo*

Teste da Síntese não programada de DNA em células hepáticas de mamíferos

2. *In vitro e In vivo*

Teste do Cometa em células de mamíferos

De acordo com a Tabela 2, podem ser realizados dois tipos de avaliação para detectar o efeito toxicogénico dos mais diferentes agentes: estudos de mutagenicidade e genotoxicidade. O primeiro mede danos diretos e irreversíveis no DNA e que podem ser transmitidos às células filhas, caso não sejam letais; o segundo mede efeitos iniciais, ou seja, danos potencialmente reversíveis no DNA (quebras ou aductos que podem ainda ser reparados) (OECD, 2015). Na sequência, são apresentados com mais detalhes os dois testes utilizados no presente estudo: o teste do cometa e o teste do micronúcleo em eritrócitos de camundongos. O teste do cometa, também denominado *Single Cell Gel Assay* (SCGA), é um ensaio eletroforético utilizado para a detecção de danos primários no DNA (quebras de fita simples e dupla e sítios álcali-lábeis) de células individualizadas (Ostling & Johanson, 1984). O teste, na versão neutra ou alcalina ($\text{pH} > 13$), é amplamente utilizado principalmente para identificação de agentes genotóxicos, estudo de reparo do DNA e biomonitoramento ambiental (Gontijo & Tice, 2003). A metodologia se baseia em células individualizadas imersas em uma malha de agarose e que são lisadas e isoladas de proteínas e membranas celulares, permanecendo apenas os nucleóides. Esses são submetidos a um campo elétrico no qual os fragmentos de DNA migram para o ânodo, adquirindo o formato de cometa (a região nuclear a cabeça e os fragmentos a cauda do cometa, cuja extensão está relacionada à intensidade de danos no DNA). Os danos no DNA detectados pelo teste do cometa (Figura 3) podem ser reparados e não fixados após um ciclo de divisão celular, e, portanto, podem não resultar em mutação (Gontijo & Tice, 2003).

Diferentemente do teste do cometa, o teste do micronúcleo detecta alterações cromossômicas resultantes de quebras (efeito clastogénico) ou de defeitos no aparato mitótico celular (efeito aneugénico). A técnica se baseia na identificação de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não são incorporados no núcleo principal da célula filha após a divisão celular (micronúcleos). O teste do micronúcleo pode

ser realizado em diversos tipos celulares, desde que sejam células com capacidade de duplicação. No caso da medula óssea de roedores, a sequência de eventos para a formação do micronúcleo é apresentada na Figura 4.

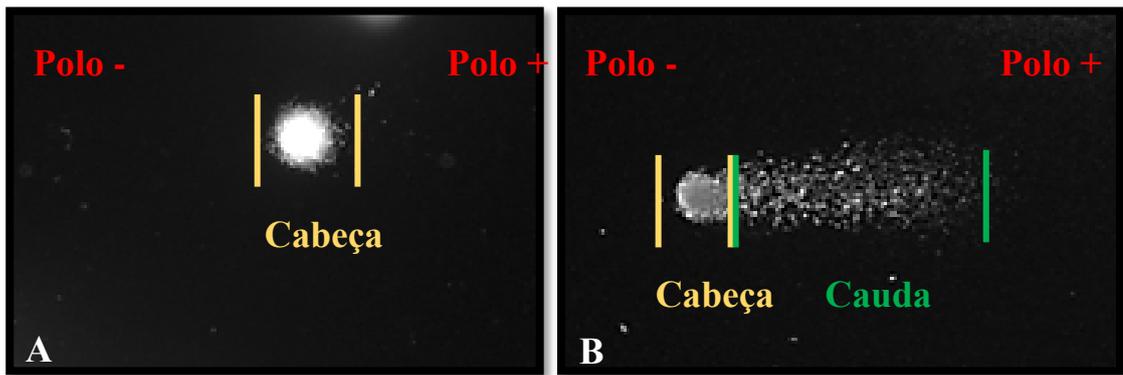


Figura 3. Fotomicrografia de células submetidas a eletroforese (teste do cometa). (A) Nucleóide íntegro – cabeça; (B) nucleóide e a cauda formada por fragmentos de DNA, conferindo aspecto de cometa.

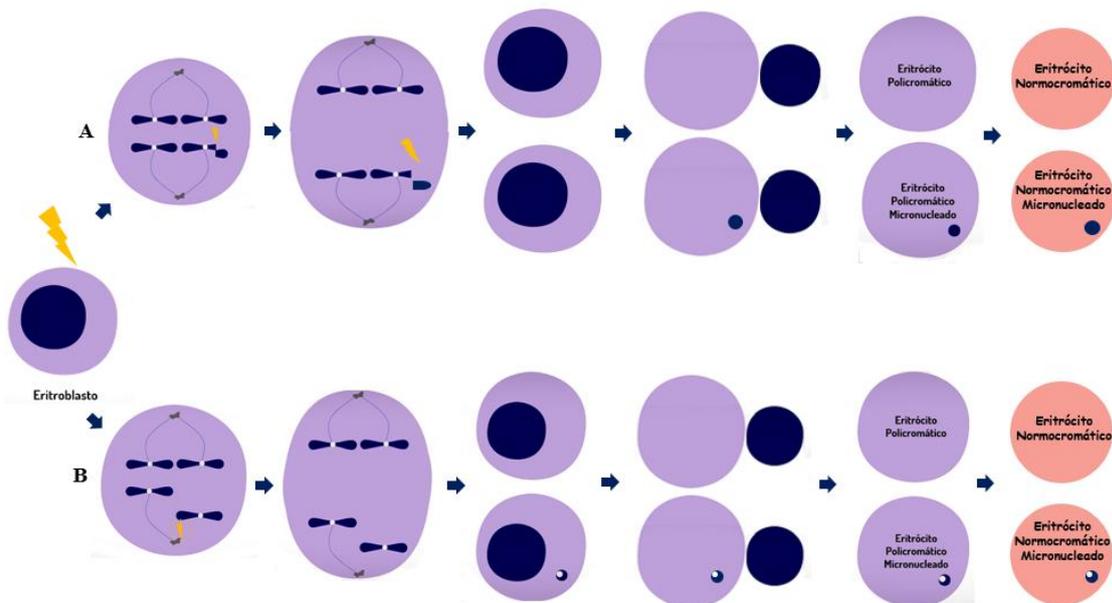


Figura 4. Esquema mostrando o processo de divisão eritrocitária e formação de micronúcleos em medula óssea de roedores. (A) Dano de origem clastogênica; (B) dano de origem aneugênica. Adaptado de MutaGen – Brasil; www.youtube.com/watch?v=rFO7Mn4O1As.

2.5. Modulação gênica e a gênese de doenças

O câncer, por exemplo, é uma desordem genética causada por mutações do DNA, sejam elas espontâneas ou induzidas. As mutações espontâneas em seres humanos ocorrem a uma taxa de aproximadamente 10^{-6} por gene a cada divisão celular, devido a falhas em alguns processos celulares de reparação. As mutações induzidas, geralmente estão associadas à exposição a agentes mutagênicos e carcinogênicos presentes no ambiente (Ferguson et al., 2015). As variações genéticas relacionadas ao processo carcinogênico podem ser consequências de mudança de nucleotídeos únicos ou rearranjos, ampliações e deleções cromossômicas. Os genes mutados que estão relacionados ao desenvolvimento do câncer podem ser classificados em supressores tumorais e oncogenes. Os genes supressores tumorais são responsáveis por inibir a proliferação celular, evitando, assim, o desenvolvimento de tumores. Os proto-oncogenes, por sua vez, são genes importantes para a codificação de proteínas reguladoras da divisão e diferenciação celular e, quando mutados, dão origem aos oncogenes e iniciam o processo de carcinogênese (Ferguson et al., 2015).

Tendo em vista a importância da função de genes na carcinogênese e metabolização de xenobióticos, torna-se relevante avaliar, além da presença de mutações, seus perfis de expressão em diferentes tecidos. Dentre os genes, especial atenção tem sido direcionada para aqueles relacionados a atividades de modulação do ciclo celular e metabolização de xenobióticos, como o *TP53*, *CDKN1A*, *CYP1A1* e *NAT2*. De fato, *CDKN1A* codifica uma quinase dependente de ciclina P21, a qual regula o ciclo celular sinalizando a presença de lesão no DNA e promovendo o bloqueio do ciclo. Quando a proteína P21 encontra-se em baixas concentrações, promove a interrupção do ciclo celular na fase G1/S, fazendo com que a replicação do DNA cesse; em alta concentração, regula processos de apoptose e transcrição gênica (Cazzalini et al., 2010). Como a proteína P21 atua na inibição da proliferação celular, esta foi inicialmente considerada como supressora tumoral. Entretanto, alguns estudos

também indicam que o gene responsável por sua codificação, o *CDKN1A*, pode atuar como oncogene, exercendo atividade antiapoptótica (Gartel & Tyner, 2002; Yeganeh et al., 2016). Alterações na expressão desse gene foram observadas em diversos tipos de cânceres, como o cabeça e pescoço, mama, pulmão, colo do útero, ovário e fígado (Erber et al., 1997; Jiang et al., 1997). Outro importante gene supressor tumoral é o *TP53* o qual, quando mutado, está relacionado a uma variedade de tumores. O *TP53* é responsável por codificar um fator de transcrição, a proteína p53, a qual interrompe o ciclo celular na fase G1, regulando o início de eventos de morte celular programada.

O processo de metabolização de xenobióticos possui basicamente duas fases, a fase I, correspondente a processos de ativação metabólica, e a fase II, de detoxificação. A fase I é caracterizada pela atuação das enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYP), na qual o gene *CYP1A1* codifica um membro importante na catalisação de reações de ativação, em que uma molécula pró-mutagênica torna-se mutagênica. O *NAT2* codifica a proteína N-acetiltransferase que participa do processo de detoxicação importante para a proteção celular contra o estresse ambiental e oxidativo. A enzima participa da fase II do metabolismo de xenobióticos, podendo atuar por meio de N-acetilação, anterior a fase I de metabolização pelo complexo citocromo P450 (CYP450), ou após a fase I, pela N-acetilação. Ambas as vias podem resultar em adutos de DNA (Wormhoudt *et al.*, 1999; Oda *et al.*, 2008).

3. HIPÓTESE DO ESTUDO

Há estudos que demonstraram que os *non-Cl* PBTAs podem desencadear diversas desordens genéticas, dentre as quais as relacionadas ao processo carcinogênico, ao envelhecimento precoce, à infertilidade e a outras anomalias. De fato, a literatura tem mostrado que alguns PBTAs apresentam potencial toxicogenético *in vitro*. Assim sendo, pode-se supor que o *non-Cl* PBTA-9, derivado do corante azo C.I. Disperse Violet 93, pode também apresentar atividade toxicogenômica *in vivo*, e este ser um dos mecanismos que associam PBTAs à gênese de diversas doenças.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o potencial toxicogenômico do 2-fenilbenzotriazol não clorado, o *non-Cl* PBTA-9, em modelo experimental *in vivo*.

4.2 Específicos

Avaliar, em camundongos:

- os níveis de danos primários no DNA (quebras de cadeia e sítios álcali-lábeis) de células sanguíneas, hepáticas e do cólon.
- a frequência de alterações citogenéticas (micronúcleos) em células de medula óssea;
- alterações no padrão transcricional dos genes *TRP53*, *CDKN1A*, *CYP1A1* e *NAT2* em células hepáticas;
- a histologia hepática.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados camundongos adultos (8 semanas) machos da linhagem *Swiss*, adquiridos do Centro de Pesquisa e Produção de Animais do Instituto de Biotecnologia (CPPA/IBTEC) e mantidos no biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Os animais, com a sanidade atestada pelo fornecedor, foram aclimatados durante duas semanas, mantidos durante todo o período experimental sob condições controladas de temperatura (22-24 °C) e ciclo de luz de 12h claro/escuro e recebendo água filtrada e ração comercial *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Protocolo CEUA nº1254/2017 vide anexo), antes do início do estudo.

5.2 Composto-teste

As amostras do *non-Cl* PBTA-9 foram gentilmente fornecidas pelo Grupo de Pesquisa liderado pela Dra. Patrícia Prediger, e sua aluna MSc. Josiane Vendemiatti, da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A semi-síntese do composto foi realizada pela reação redutora do corante C.I. Disperse Violet 93 (DV93) com ferro metálico, sob temperatura controlada, e foi posteriormente analisada por cromatografia em camada delgada (CCD, do inglês *thin-layer chromatograph*). O composto foi detectado com ninhidrina e isolado por cromatografia *flash*.

A definição das doses testadas do *non-Cl* PBTA-9 foi realizada com base nas concentrações do DV93 encontradas em rios do interior do Estado de São Paulo, próximos a região de indústrias têxteis (Rio Piracicaba/SP: 6,81µg/L; Rio Quilombo/SP 2,81µg/L) (Vacchi et al., 2017). Para o tratamento agudo (único) foram testadas três doses, as quais

foram estabelecidas para camundongos de aproximadamente 30g, conforme equação a seguir (ATSDR, 2005):

$$D = \frac{C \times FE \times TI}{PC} \quad D = \frac{6,91 \mu\text{g/L} \times 0,0035 \text{ L} \times 1}{0,03 \text{ kg}} = 0,806 \mu\text{g/kg p.c.}$$

D = Dose de exposição

C = Concentração do *Disperse Violet 93*

FE = Fator de exposição (consumo hídrico diário médio para camundongos)

TI = Tempo de exposição (dia)

PC = Peso corpóreo

Dessa forma, foram estabelecidas as doses de 5, 50 e 500 $\mu\text{g/kg p.c.}$, que correspondem, respectivamente, a aproximadamente 10, 100 e 1000 vezes a aquelas do DV93 encontradas em rios.

5.3 Delineamento experimental

Os experimentos foram realizados em duas etapas, utilizando-se o mesmo protocolo de tratamento e animais distribuídos em seis grupos, a saber:

- Grupo 1 (controle negativo): animais tratados somente com água filtrada e ração durante o período experimental;
- Grupo 2 (controle positivo): animais tratados com a *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU; 50 mg/kg de peso corpóreo – p.c.), por via intraperitoneal;
- Grupo 3 (controle do veículo de dissolução do *non*-Cl PBTA-9): animais tratados com DMSO 0,5% (0,1 ml/10 g p.c.), por via gástrica (*gavage*);
- Grupos 4, 5 e 6: animais por grupo, tratados, respectivamente, com 5, 50 e 500 $\mu\text{g/kg p.c.}$ do *non*-Cl PBTA-9, por via gástrica.

Na primeira etapa (n = 56 camundongos), após 6 horas dos respectivos tratamentos foi feita coleta de amostra de sangue periférico (aproximadamente 20 μ L) pela veia facial e, após outras 18 horas (total de 24h) foi realizada a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, momento em que foram retirados os fêmures para a dissecação da medula óssea e fígado para análise de expressão gênica. Na segunda etapa (n = 45), a eutanásia dos animais, por deslocamento cervical, foi realizada 24 horas após tratamentos, momento em que foram retirados o fígado e o cólon para realização do teste do cometa.

5.4 Teste do micronúcleo

O potencial mutagênico do *non*-Cl PBTA-9 foi avaliado pelo teste do micronúcleo, de acordo com os procedimentos descritos no Protocolo n°474 da OECD (2016). Após a eutanásia, a medula óssea dos dois fêmures foi transferida para um tubo cônico contendo 2,5 mL de soro fetal bovino. A suspensão celular resultante foi centrifugada a 1.000 rpm por 5 minutos, e descartado cerca de 2 mL do sobrenadante. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, 2 gotas do sedimento celular foram colocadas nas extremidades de uma lâmina de vidro e realizado o esfregaço. Após serem secas em temperatura ambiente por 24 horas, as lâminas foram coradas com Giemsa puro, por 3 minutos, e, em seguida, submersas em Giemsa na diluição de 1:6, por 15 minutos. Depois de lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente, as lâminas foram submersas em xilol diluído em água (1:3) e montadas com lamíluas e resina *Entellan*[®] para preservação. A análise das células foi realizada em microscópio óptico de luz, em aumento de 1.000x (objetiva com óleo de imersão). Os eritrócitos policromáticos (PCEs) foram identificados pela coloração basófila e os eritrócitos normocromáticos (NCEs) pela coloração acidófila (Figura 5) A frequência de PCEs micronucleados foi investigada em 4000 PCEs por animal e o potencial citotóxico a partir do índice de divisão nuclear, obtido por meio da equação $IDN = PCE / (PCE + NCE)$ de 600 células

por animal, conforme sugerido no *Guideline* da OECD nº474 (OECD, 2016). Para a análise da frequência de células micronucleadas foi utilizada a distribuição de Poisson para eventos raros e o teste de ANOVA para a citotoxicidade. Foram considerados como significativo valores de $p < 0,05$.

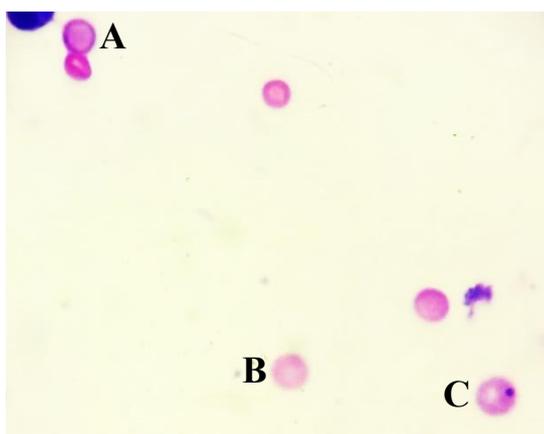


Figura 5. Fotomicrografia de esfregaço de medula óssea de camundongo. A; eritrócito policromático. B; eritrócito normocromático. C; eritrócito policromático micronucleado. Coloração Giemsa; aumento de 1000x.

5.5 Teste do cometa

5.5.1 Obtenção de células

O teste do cometa foi realizado em células sanguíneas, seguindo a metodologia descrita por Gontijo & Tice (2003), com modificações sugeridas por Burlinson (2012). Para o teste do cometa em células sanguíneas, após 6 horas dos respectivos tratamentos, foi coletado 20 μ L de sangue periférico e homogeneizado em 180 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (LMP, do inglês *low melting point*) 0,5% a 37°C. Para o teste do cometa em células do fígado e cólon, após 24 horas de exposição, os animais foram submetidos a eutanásia e coletado fragmentos dos tecidos, de aproximadamente 0,5 cm³, lavados em solução PBS suplementada 1X (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ *free*, heptahidratado) contendo EDTA (20 mM) e 10% de DMSO, a 4°C, com o intuito

de minimizar os danos oxidativos causados pelo ferro no sangue, por espécies reativas de oxigênio e endonucleases.

Para a obtenção da suspensão de células hepáticas, o fragmento do tecido foi fracionado em solução PBS suplementada, seguido de lavagens sucessivas para eliminar as células superficiais e danificadas. Após a decantação, foi realizada a coleta do sobrenadante para a confecção das lâminas. A suspensão celular do cólon foi obtida por meio de um tratamento enzimático, no qual o fragmento do cólon foi transferido para um tubo contendo proteinase K (0,1mg/mL) e mantido em agitação leve a 37 °C durante 35 minutos. Em seguida, o fragmento foi fracionado e centrifugado a 800 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e coletada amostra do sedimento celular para a confecção das lâminas.

5.5.2 Preparação de lâminas, eletroforese e análise microscópica

As lâminas foram preparadas em duplicata, a partir de 30µL da suspensão celular de cada órgão homogeneizados em 170µL de agarose LMP. As misturas de suspensão celular e agarose LMP foram colocadas sobre duas lâminas (100 µL/cada) previamente recobertas com agarose de ponto de fusão normal, uma lamínula foi colocada para espalhar uniformemente o material sobre a lâmina que foi e deixada a 4°C por 5 minutos para a solidificação da agarose. Após esse período, a lamínula foi cuidadosamente removida e as lâminas colocadas em solução lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 10%, Triton-X 100 1%; pH 10), a 4°C, por 24 horas, protegidas de luz. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS por 5 minutos e colocadas em cuba de eletroforese preenchida com solução alcalina (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM; pH >13) na temperatura de 4°C, por 20 minutos, para o desenovelamento do DNA. Em seguida, foi realizada a eletroforese a 25 volts (1,0 V/cm, 300 mA), por 20 minutos. Ao final da eletroforese, as lâminas foram submetidas à neutralização em solução de Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5), fixadas com etanol absoluto por 5 minutos e secas

em temperatura ambiente. No momento da análise, as lâminas foram coradas com solução aquosa de SYBR® Gold (1:9999). A análise de 150 nucleoides animal, em aumento de 400x, foi realizada em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de análise de imagens (*Comet Assay IV, Perceptive Instruments, Inglaterra*). Como parâmetro indicativo de danos no DNA foi utilizada a porcentagem de DNA na cauda do cometa (*tail intensity*) (Figura 6). A análise estatística dos dados (% de *tail intensity*) obtidos a partir do sangue, fígado e cólon foi realizada por meio do modelo Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn de comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativo.

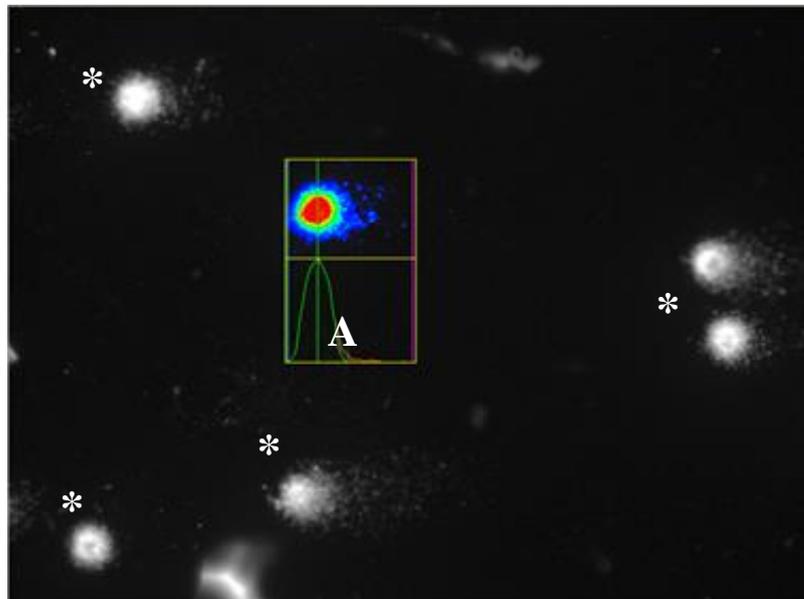


Figura 6. Fotomicrografia de células sanguíneas de camundongos coradas com solução aquosa de SYBR Gold (1:9999). (A) Quantificação da porcentagem de DNA fragmentado na cauda do nucleóide (% tail intensity) pelo software Comet Assay IV. Aumento de 400x; *nucleóides.

5.6 Análise de expressão gênica em células hepáticas

5.6.1 Extração e quantificação de RNA

Fragmento central do lóbulo direito do fígado foi coletado e lavado em PBS suplementado (PBS⁺⁺), em seguida armazenado em criotubo em nitrogênio líquido e posteriormente mantido em freezer -80°C até a extração do RNA. Esta foi realizada utilizando-se do *kit* Direct-zolTM RNA MiniPrep Plus (Zymo Research), de acordo com as recomendações do fabricante. A extração consistiu em macerar aproximadamente 50 mg do fragmento do fígado em solução de *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen) para obtenção de suspensão celular e lise da membrana, seguido de tratamentos enzimáticos em coluna sílica (Zymo-spin IIC Column – Zymo Research) e eluição do RNA total. O RNA foi imediatamente quantificado em espectrofotômetro (*NanoDropTM OneC Spectrophotometer* - Thermo Fisher Scientific) e considerado livre de impurezas proteicas e compostos fenólicos a partir dos parâmetros 280/260nm e 280/230nm, em razões entre 1,8 - 2,2. As amostras de RNA foram armazenadas em freezer a -80 °C, até o momento da síntese do cDNA.

5.6.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT)

A partir de 1 µg do RNA total foi realizada a síntese de cDNA utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Thermo Fisher Scientific). A cada amostra foram adicionados 30µL do mix (RT *Buffer* 10X, RT *Random Primers*, dNTP *Mix*, MultiScribe® *Reverse Transcriptase* e H₂O *Nuclease Free Water*), 1µg de RNA e 60µL de água RNase/DNase *free* q.s.p.. As amostras seguiram para o termociclador na configuração de 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 4°C infinito. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até a etapa de PCR. As etapas de PCR foram conduzidas em termociclador automático (ABI Prism 7500 *FAST SequenceDetection System*, AppliedBiosystems) e, para amplificação, foi utilizado o sistema *TaqMan*® (AppliedBiosystems) composto por um mix

universal de reagentes (*TaqMan® Universal PCR Master Mix*) e uma sonda para cada gene marcada com o flurocromo FAM-MGB, específica para camundongo, e cujas especificações estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Nomenclatura e informações complementares das sondas utilizadas na avaliação toxicogenômica do *non*-Cl PBTA-9

Gene	Entrez Gene ID	Assay ID (ThermoFisher)	Localização cromossomal
<i>NAT2</i>	17961	Mm01349018_m1	Chr.8: 67494875 - 67502644
<i>CYP1A1</i>	13076	Mm00487218_m1	Chr.9: 57687928 - 57703824
<i>TRP53</i>	22059	Mm01731287_m1	Chr.11: 69580359 - 69591873
<i>CDKN1A</i>	12575	Mm00432448_m1	Chr.17: 29090986 - 29100722

A plataforma utilizada para análise estatística dos dados foi a *Thermo Fisher Connect qPCR analysis apps (Thermo Fisher Cloud 2.0 -<https://apps.thermofisher.com>)*, método do *Threshold cycle (Ct) Comparativo ($\Delta\Delta Ct$)*, utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que: $\Delta\Delta Ct =$ média do ΔCt (gene alvo:) - média do ΔCt (gene de referência: *ACTB*). Genes com valores de *Fold change* $\geq 2,0$ e com valor de $p < 0,05$, foram considerados super expressos.

5.7 Análise histopatológica

Para a realização da análise histológica, fragmentos do fígado foram acondicionados em cassetes histológicos e mantidos em frascos contendo formalina tamponada 10% para fixação e mantidos por 12 horas a 4°C. Em seguida, os fragmentos foram transferidos a concentrações graduais de álcool anidro hidratado (99,3°). Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em solução de álcool anidro hidratado e xileno, na proporção 1:1, durante 1 hora. Após banhos em xileno com intervalos de 1 hora, os fragmentos foram emblocados em parafina e

cortados em micrótomo para a confecção das lâminas que foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). A análise histopatológica foi realizada em microscópio óptico de luz e foram avaliadas a presença de focos de células eosinófilas, células basofílicas, hiperplasia de células ovais, congestão vascular, necrose, esteatose e glicogenose hepática. As lâminas foram confeccionadas por José Carlos Pedroso de Lima, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, e as análises realizadas pela Dra. Noeme Sousa Rocha da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu.

6. RESULTADOS

Durante o período de experimentação animal não foram observadas alterações no perfil comportamental, tampouco lesões macroscópicas nos animais tratados com o *non*-Cl PBTA-9.

6.1 Teste do micronúcleo

Os animais tratados com o *non*-Cl PBTA-9 nas doses de 5 e 50 µg/kg apresentaram aumento significativo na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs). Os valores médios do Índice de Divisão Nuclear (IDN) demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos, sugerindo ausência de citotoxicidade induzida pelo do *non*-Cl PBTA-9 (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos tratados com o *non*-Cl PBTA-9

Tratamentos	Nº animais	Nº células analisadas	PCEMNs		IDN (média ± DP)
			Nº	(%)	
Controle Negativo ¹	10	40.000	36	(0,09)	0.39 ± 0.04
Controle Veículo ²	9	36.000	30	(0,08)	0.38 ± 0.03
Controle Positivo ³	7	24.000	268	(1,12)	0.41 ± 0.06
<i>Non</i> -Cl PBTA-9					
5 µg/kg	10	40.000	77	(0,19)*	0.40 ± 0.02
50 µg/kg	10	40.000	57	(0,14)*	0.42 ± 0.03
500 µg/kg	10	40.000	50	(0,12)	0.41 ± 0.04

IDN: índice de divisão nuclear (PCE/PCE+NCE); ¹água filtrada; ²dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%; ³*N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU) (50 mg/kg p.c). *p < 0,05 em relação ao controle do veículo da dissolução (DMSO).

6.2 Teste do cometa

Os dados obtidos a partir do teste do cometa em células do sangue periférico e fígado, revelaram aumento de danos primários no DNA apenas nos animais tratados com a maior dose do *non*-Cl PBTA-9 (500 µg/kg). Em contraste, todas as doses (5, 50 e 500µg/kg) apresentaram efeito genotóxico em células do cólon (Figura 7).

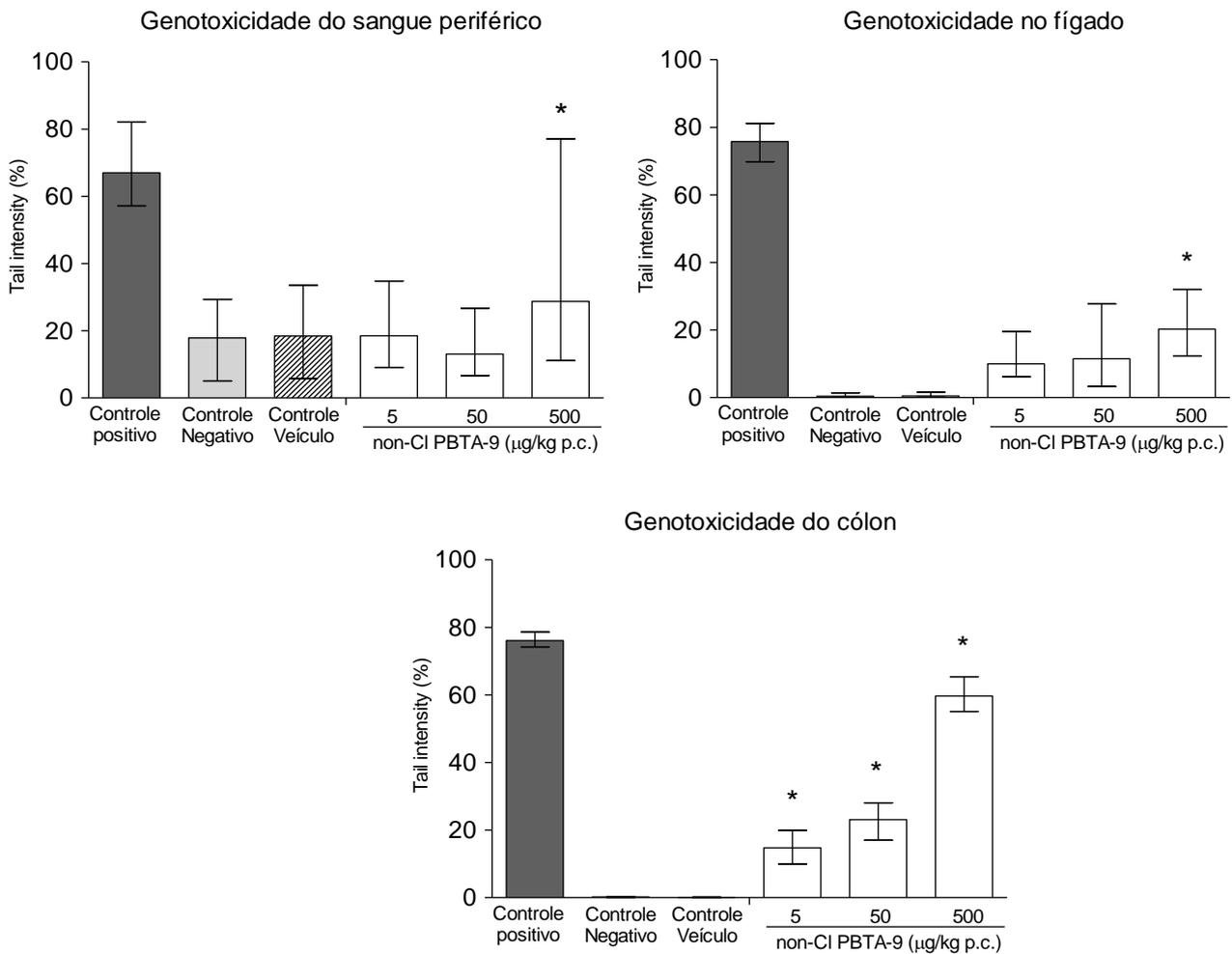


Figura 7. Danos no DNA (tail intensity) de células do sangue periférico, fígado e cólon de camundongos tratados com o *non*-Cl PBTA-9. Controle positivo (MNU 50 mg/kg p.c.); controle negativo – água filtrada; controle do veículo de dissolução (0,5% DMSO); * $p < 0,001$ em relação ao controle do veículo (DMSO).

6.3 Análise de expressão gênica

A análise transcricional das células hepáticas mostrou que nenhuma das doses do *non*-CI PBTA-9 (5, 50 e 500µg/kg p.c.) alterou a expressão dos genes avaliados (*NAT2*, *TRP53*, *CYP1A1* e *CDKN1A*) (Figura 8).

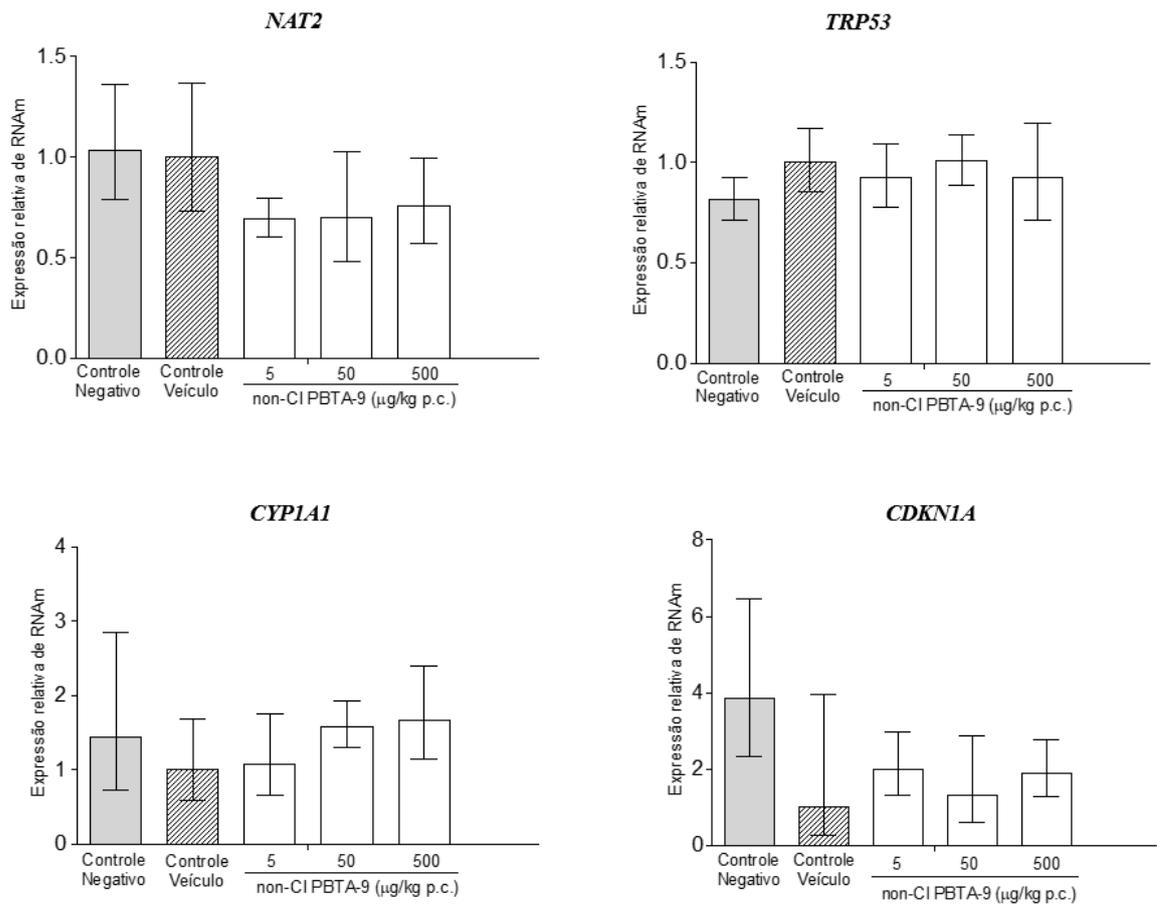


Figura 8. Expressão relativa de RNAm para os genes *NAT2*, *TRP53*, *CYP1A1* e *CDKN1A* em células hepáticas de camundongos tratados com o *non*-CI PBTA-9 (5, 50 e 500µg/kg p.c.). Controle negativo (água filtrada); controle do veículo de dissolução (0,5% DMSO).

6.4 Histologia do fígado

Não foram observadas alterações na homeostase hepática após exposição ao *non-Cl* PBTA-9 nas doses de 5, 50 e 500 μ g/kg p.c. (Figura 9).

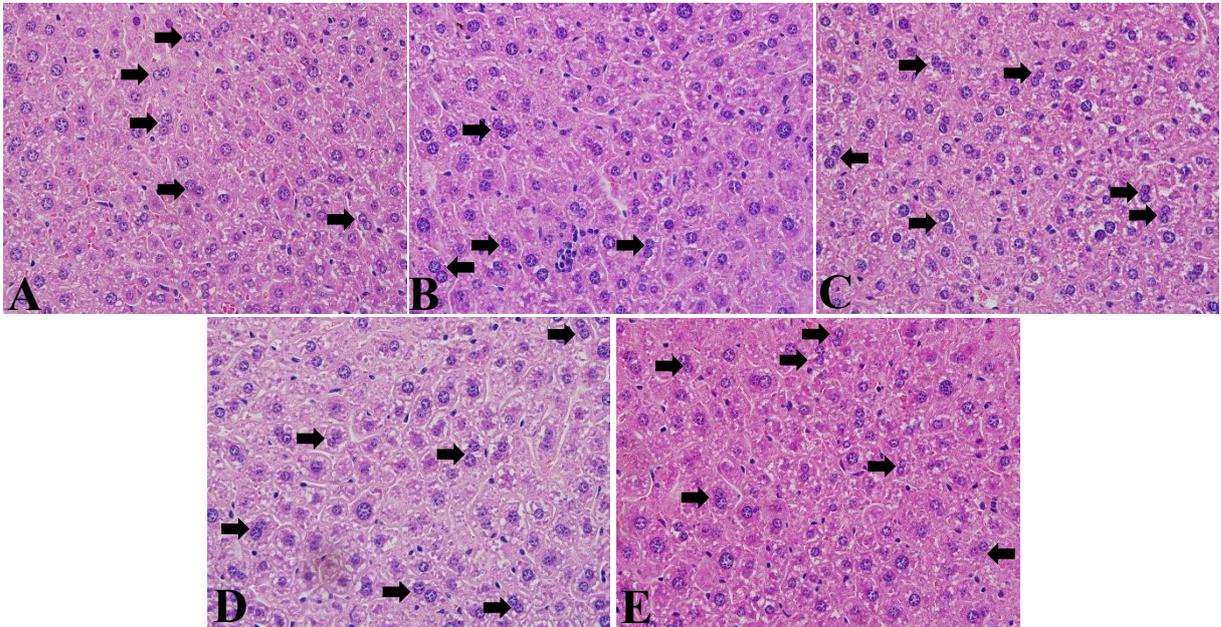


Figura 9. Fotomicrografias de fígado de camundongos. A – controle positivo; B – controle do veículos de dissolução (0,5% DMSO); C – grupo tratado com 5 μ g/kg p.c do *non-Cl* PBTA-9; D – grupo tratado com 50 μ g/kg p.c do *non-Cl* PBTA-9; E – grupo tratado com 500 μ g/kg p.c do *non-Cl* PBTA-9. As setas indicam células binucleadas. Coloração de hematoxilina-eosina, aumento de 400x.

7. DISCUSSÃO

A influência da atividade industrial têxtil é muitas vezes nociva para o ambiente, devido a compostos e subprodutos intermediários que são descartados em rios. Sabe-se, que mesmo após o tratamento por métodos convencionais, compostos tóxicos não são totalmente eliminados e podem ser ingeridos pela população que utiliza a água para o seu consumo (Carneiro et al., 2010; Zocolo et al., 2015; Vacchi et al., 2017). Assim sendo, no presente estudo foi avaliado, *in vivo*, o potencial genotóxico e mutagênico do *non*-Cl PBTA-9, importante poluente ambiental derivado do corante Disperse Violet 93 (DV93), o qual, segundo Vendemiatti et al. (2017), é encontrado em altas concentrações em rios sob a influência da indústria têxtil no Estado de São Paulo. Os resultados mostraram evidente atividade genotóxica (aumento de danos primários no DNA) em células do sangue periférico, fígado, cólon, e mutagênica (aumento da frequência de micronúcleo em células de medula óssea de camundongos). Embora este seja o primeiro estudo *in vivo* avaliando o *non*-Cl PBTA-9, seu efeito mutagênico *in vitro* foi descrito por Vendemiatti et al. (2017), que observaram aumento de mutações na linhagem YG1041 de *Salmonella thyphimurium*, especialmente após ativação metabólica (S9+).

A literatura relata o potencial mutagênico de outros subprodutos de corantes azoicos semelhantes ao *non*-Cl PBTA-9. Masuda et al., (2004), por exemplo, detectaram o potencial toxicogenético *in vivo* do PBTA-6 em células branquiais do peixe dourado (*Carassius auratus*). Estudos realizados com alguns PBTA's clorados (PBTA-1, PBTA-2 e PBTA-4) encontrados em amostras de água coletadas de rio em Kyoto - Japão mostraram a atividade mutagênica desses compostos nas linhagens TA98 e YG1024 de *Salmonella typhimurium* (Ohe et al., 1999; Nukaya et al., 2001). Esses achados foram complementados por Watanabe et al. (2001) que, também utilizando o teste de Ames (linhagens YG1024 e YG1029),

detectaram atividade mutagênica em 87% das amostras de água coletadas em rios do Japão. Segundos esses pesquisadores, a presença de PBTAs seria responsável por aproximadamente 50% dessa atividade. Da mesma forma, Matsuoka *et al.* (2001) avaliando o potencial mutagênico dos PBTA-1 e PBTA-2 clorados e não clorados, além de corantes precursores azoicos, encontraram aumento de células micronucleadas em linhagens celulares de hamster chinês (CHL e VL9MZ), especialmente após o tratamento com os PBTAs e *non-Cl* PBTAs, que apresentaram maior mutagenicidade que os azo corantes.

Nossos achados mostraram que as células do cólon foram as mais sensíveis ou alvo principal da ação genotóxica do *non-Cl* PBTA-9, uma vez que todas as doses do composto induziram o aumento de danos primários no DNA. Esse fato poderia ser explicado pela via percorrida pelo *non-Cl* PBTA-9 após o tratamento oral (*gavage*), que após atravessar o estômago e o intestino delgado, chega ao cólon, local da absorção e com presença significativa de microorganismos metabolizadores (bactérias anaeróbicas e bactérias anaeróbicas facultativas). Embora a via de metabolização do *non-Cl* PBTA-9 não ser ainda conhecida, não se pode descartar a hipótese deste sofrer metabolização, dando origem a metabólitos tóxicos no cólon (Edwards, 1993; Freire *et al.*, 2006).

A literatura ainda não é clara sobre o mecanismo da ação mutagênica de PBTAs. No entanto, Shiozawa *et al.* (1999), em estudos sobre a relação estrutura-atividade do PBTA-1, concluíram que o grupamento amino primário poderia ser o responsável pela mutagenicidade do composto. Achado surpreendente do nosso estudo foi o fato de apenas as duas menores doses do *non-Cl* PBTA-9 (5 e 50 µg/kg p.c) terem apresentado potencial mutagênico no teste do micronúcleo em células de medula óssea, e o teste de citotoxicidade não ter evidenciado atividade tóxica da dose mais alta (500 µg/kg p.c.). Da mesma forma, não foi observado efeito citotóxico do *non-Cl* PBTA-9 na dose de 500 µg/kg em leucócitos do sangue periférico (viabilidade celular > 70%), apesar do evidente potencial genotóxico. Curiosamente,

Fernandes *et al.* (2018) encontraram resultado semelhante quando avaliaram o corante Disperse Red 1 (DR1) *in vivo*, ou seja, além da ausência de potencial mutagênico apenas para a dose mais alta testada, não detectaram efeito citotóxico pela análise da relação PCE/NCE. Segundo esses autores, uma possível explicação para tais achados seria a baixa sensibilidade ou especificidade do índice utilizado (relação PCE/NCE) para a detecção da ação citotóxica do composto. Da mesma forma, Chequer *et al.* (2009) avaliando o DR1 em linfócitos humanos e células HepG2 *in vitro*, atribuíram a baixa frequência de células micronucleadas e a ausência de citotoxicidade observadas para a dose mais alta testada (4µg/mL), à baixa sensibilidade do índice adotado (Índice de Proliferação do Bloqueio de Citocinese; IPBC). No entanto, esses autores observaram que, embora nenhuma alteração tenha sido detectada pelo IPBC, havia número limitado de células analisáveis nas culturas tratadas com a dose mais alta. Anteriormente, Matsuoka *et al.* (2000), estudando os efeitos de alguns PBTAs em células de hamster chinês descreveram que, enquanto concentrações mais baixas do PBTA-2 (0,78, 1,56 e 3,125 µg/mL) foram capazes de causar atraso no ciclo celular, a mais alta (6,25 µg/mL) causou apenas moderado atraso devido a maior citotoxicidade.

Nossos dados mostraram que o *non*-Cl PBTA-9, em nenhuma das doses testadas, atuou modulando a expressão dos genes *CDKN1A* e *TP53* envolvidos no controle do ciclo celular e tampouco dos genes *NAT2*, *CYP1A1*, relacionados ao metabolismo de xenobióticos. Estudos sobre o metabolismo de PBTAs têm demonstrado a importância do citocromo P450 (CYP) e das N-acetiltransferases (NATs) para a atividade genotóxica do PBTA-4, PBTA-6, PBTA-7 e PBTA-8. Os achados mostram que o P4501A1 e as *NAT1* e *NAT2* estão especialmente envolvidos com a ativação genotóxica dos PBTAs (Oda *et al.*, 2008; Ulecia & Carey, 2018). Ulecia & Carey (2018), por meio de simulações *in silico*, estudaram as interações das moléculas de potentes PBTAs clorados (PBTA-4, PBTA-6, PBTA-7 e PBTA-8) com o objetivo de elucidar os mecanismos de ativação. Os resultados indicaram que os

PBTAs podem ser ativados pelo gene *CYP1A1*, o que aumentaria o potencial mutagênico. A ausência de alteração transcricional observada no nosso estudo pode ter ocorrido pelo fato dos genes investigados não estarem fortemente envolvidos no metabolismo do *non-Cl* PBTA-9; as células analisadas (hepatócitos) não serem o principal local de metabolização do composto; as doses testadas não terem sido suficientes para modular a expressão dos genes. Estudos relacionados ao metabolismo dos PBTAs são escassos, os poucos trabalhos existentes realizaram testes *in vitro* e *in silico*, e associaram o metabolismo ao principal órgão metabolizador de xenobióticos contendo amina aromática, o fígado. Porém, sendo o primeiro estudo *in vivo* realizado com *non-Cl* PBTA, a descoberta pode indicar que a metabolização dos compostos da família do PBTA, pode ocorrer no cólon por bactérias.

Finalizando, embora o mecanismo de ação e distribuição do *non-Cl* PBTA-9 seja ainda um grande desafio para estudos futuros, é fato que o composto apresenta claro efeito toxicogênico e que, portanto, seu uso ou exposição deve ser cuidadosamente monitorado a fim de evitar riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

8. CONCLUSÃO

Os dados obtidos a partir de camundongos após exposição aguda ao *non-Cl* PBTA-9 permitiram concluir que esse composto:

I - induz danos primários no DNA de células do cólon em todas as doses testadas (5, 50 e 500 µg/kg p.c.) e em células hepáticas e sanguíneas na dose mais alta (500 µg/kg p.c.);

II - apresenta efeito mutagênico nas doses 5 e 50 µg/kg p.c. em células da medula óssea;

III - não altera a expressão dos genes *NAT2*, *CYP1A1*, *CDKN1A* e *TRP53* em células hepáticas;

IV - não promove alterações histológicas no fígado.

Em linhas gerais, a exposição ao *non-Cl* PBTA-9 *in vivo* é capaz de promover danos no material genético (atividade genotóxica e mutagênica). Os dados, inéditos, mostram o perigo da exposição ao composto e contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos de ação dessa classe de poluente ambiental. Adicionalmente, os resultados poderão subsidiar políticas públicas para o descarte e tratamento de efluentes gerados pela indústria têxtil.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves de Lima RO, Bazo AP, Salvadori DMF, Rech CM, de Palma Oliveira D, de Aragão Umbuzeiro G. 2007. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 626:53–60.

Amaral MC do, Zonatti WF, Silva KL da, Karam Junior D, Amato Neto J, Baruque-Ramos J. 2018. Industrial textile recycling and reuse in Brazil: case study and considerations concerning the circular economy. *Gest Produção*. 25:431–443.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2005. Appendix G: Calculating Exposure Doses; Public Health Assessment Guidance Manual PHA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/hac/PHAManual/appg.html>.

Burlinson B. 2012. The In Vitro and In Vivo Comet Assays. In: *Methods Mol Biol* Clifton NJ. *Genet Toxicol*. 817:143–163.

Carmazen, PCV. 2007. Investigação de lesões em DNA induzidas por produtos de redução do corante C. I. Disperse Blue 291. Master's Dissertation, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/D.9.2007.tde-25102007-151610.

Carneiro PA, Umbuzeiro GA, Oliveira DP, Zanoni MVB. 2010. Assessment of water contamination caused by a mutagenic textile effluent/dyehouse effluent bearing disperse dyes. *J Hazard Mater*. 174:694–699.

Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E. 2010. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. *Mutat Res Mutat Res*. 704:12–20.

CONAMA - Ministério do Meio Ambiente. 2005. Resolução no357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

CONAMA - Ministério do Meio Ambiente. 2011. Resolução no430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.

Chequer FMD, Angeli JPF, Ferraz ERA, Tsuboy MS, Marcarini JC, Mantovani MS, de Oliveira DP. 2009. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 676:83–86.

Edwards, CA. 1993. Anatomical and physiological basis: physiological factors influencing drug absorption: Colonic drug absorption and metabolism. *Drug Pharm Sci*. 60:1-28.

- Erber R, Klein W, Andl T, Enders C, Born AI, Conradt C, Bartek J, Bosch FX. 1997. Aberrant p21CIP1/WAF1 protein accumulation in head-and-neck cancer. *Int J Cancer*. 74:383–389.
- Ferguson LR, Chen H, Collins AR, Connell M, Damia G, Dasgupta S, Malhotra M, Meeker AK, Amedei A, Amin A, et al. 2015. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin Cancer Biol*. 35:S5–S24.
- Fernandes FH, Bustos-Obregon E, Salvadori DMF. 2015. Disperse Red 1 (textile dye) induces cytotoxic and genotoxic effects in mouse germ cells. *Reprod Toxicol*. 53:75–81.
- Fernandes FH, Botasso-Nasciutti MO, Svio ALV, Souza L da CM, Fernandes-Cal JR, Cardoso FF, Fontes MR de M, Albuquerque AF, Munari CC, Kummrow F, et al. 2018. *In Vivo* genotoxicity of a commercial C.I. Disperse Red 1 dye: Genetic Hazard of Commercial Disperse Red 1. *Environ Mol Mutagen*. 59:822–828.
- Fernandes FH, Umbuzeiro G de A, Salvadori DMF. 2019. Genotoxicity of textile dye C.I. Disperse Blue 291 in mouse bone marrow. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 837:48–51.
- Freire AC, Podczek F, Sousa J, Veiga F. 2006. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I - O cólon como local de liberação de fármacos. *Rev Bras Ciênc Farm*. 42:319–335.
- Gartel AL, Tyner AL. 2002. The Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21 in Apoptosis. *Mol Cancer Ther*. 1:639-649.
- Gontijo A, Tice RR. 2003. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, editors. *Mutagênese Ambient*. Canoas: ULBRA; 247–279.
- Guaratini CC, Zanoni MVB. 2000. Corantes têxteis. *Quím Nova*. 23:71–78.
- Ghaly AE, Ananthashankar R, Alhattab M, Ramakrishnan VV. 2013. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. *J Chem Eng Process Technol*. 05:182. doi: 10.4172/2157-7048.1000182.
- Jiang M, Shao Z-M, Wu J, Lu J-S, Yu L-M, Yuan J-D, Han Q-X, Shen Z-Z, Fontana JA. 1997. p21/waf1/cip1 and mdm-2 expression in breast carcinoma patients as related to prognosis. *Int J Cancer*. 74:529–534.
- Kummrow F, Umbuzeiro GA. 2008. 2-fenilbenzotriazóis (PBTA): uma nova classe de contaminantes ambientais. *Quím Nova*. 31:401–406.
- Kunz A, Peralta-Zamora P, Moraes SG de, Durán N. 2002. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Quím Nova*. 25:78–82.
- Levine AJ. 1997. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*. 88:323–331.
- Masuda S, Deguchi Y, Masuda Y, Watanabe T, Nukaya H, Terao Y, Takamura T, Wakabayashi K, Kinae N. 2004. Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole

(PBTA-6) and 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitro-biphenyl (ADDDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 560:33–40.

Matsuoka A, Sakamoto H, Tadokoro S, Tada A, Terao Y, Nukaya H, Wakabayashi K. 2000. The 2-phenylbenzotriazole-type water pollutant PBTA-2 has cytochalasin B-mimetic activity. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 464:161–167.

Matsuoka A, Tada A, Terao Y, Nukaya H, Önfelt A, Wakabayashi K. 2001. Chromosomal effects of newly identified water pollutants PBTA-1 and PBTA-2 and their possible mother compounds (AZO DYES) and intermediates (non-CIPBTAs) in two Chinese hamster cell lines. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 493:75–85.

Ulecia MK, Carey MD. 2018. Interactions of 2-phenyl-benzotriazole xenobiotic compounds with human Cytochrome P450-CYP1A1 by means of docking, molecular dynamics simulations and MM-GBSA calculations. *Comput Biol Chem*. 74:253–262.

Nukaya H, Shiozawa T, Tada A, Terao Y, Ohe T, Watanabe T, Asanoma M, Sawanishi H, Katsuhara T, Sugimura T, Wakabayashi K. 2001. Identification of 2-[2-(acetylamino)-4-amino-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-4) as a potent mutagen in river water in Kyoto and Aichi prefectures, Japan. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 492:73–80.

Oda Y, Watanabe T, Terao Y, Nukaya H, Wakabayashi K. 2008. Genotoxic activation of 2-phenylbenzotriazole-type compounds by human cytochrome P4501A1 and N-acetyltransferase expressed in *Salmonella typhimurium* umu strains. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 654:52–57.

OECD - The Organization for Economic Co-operation and Development 2014. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development. Available from: <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264224292-en>.

OECD - The Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines. Genetic Toxicology Guidance Document: Second Commenting Round. Nov 30, 2015. <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Draft%20Guidance%20Document%20on%20OECD%20Genetic%20Toxicology%20Test%20Guidelines.pdf>.

Ohe T, Shaughnessy DT, Landi S, Terao Y, Sawanishi H, Nukaya H, Wakabayashi K, DeMarini DM. 1999. Mutation spectra in *Salmonella* TA98, TA100, and TA104 of two phenylbenzotriazole mutagens PBTA-1 and PBTA-2 detected in the Nishitakase River in Kyoto, Japan. 107:701-704.

Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res Mutat Res*. 567:109–149.

Oliveira DP, Carneiro PA, Rech CM, Zanoni MVB, Claxton LD, Umbuzeiro GA. 2006. Mutagenic compounds generated from the chlorination of disperse azo-dyes and their presence in drinking water. *Environ Sci Technol*. 40:6682–6689.

- Rauf MA, Salman Ashraf S. 2012. Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. *Chem Eng J.* 209:520–530.
- Ribeiro AR, Umbuzeiro G de A. 2014. Effects of a textile azo dye on mortality, regeneration, and reproductive performance of the planarian, *Girardia tigrina*. *Environ Sci Eur.* 26:22.
- Rodríguez E, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R. 1999. Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. *Curr Microbiol.* 38:27–32.
- Roubicek DA, Rech CM, Umbuzeiro GA. 2020. Mutagenicity as a parameter in surface water monitoring programs—opportunity for water quality improvement. *Environ Mol Mutagen.* 61:200–211.
- Schmidt C. 2018. Isolamento E Caracterização De Bactérias Eficientes Na Biodegradação De Corantes Azo Sintéticos. Dissertação (Mestrado), Curso de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado. <http://hdl.handle.net/10737/2163>.
- Shiozawa T, Suyama K, Nakano K, Nukaya H, Sawanishi H, Oguri A, Wakabayashi K, Terao Y. 1999. Mutagenic activity of 2-phenylbenzotriazole derivatives related to a mutagen, PBTA-1, in river water. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 442:105–111.
- Shiozawa T, Tada A, Nukaya H, Watanabe T, Takahashi Y, Asanoma M, Ohe T, Sawanishi H, Katsuhara T, Sugimura T, et al. 2000. Isolation and Identification of a New 2-Phenylbenzotriazole-Type Mutagen (PBTA-3) in the Nikko River in Aichi, Japan. *Chem Res Toxicol.* 13:535–540.
- Subtil EL, Mierzwa JC, Hespanhol I. 2014. Comparison between a conventional membrane bioreactor (C-MBR) and a biofilm membrane bioreactor (BF-MBR) for domestic wastewater treatment. *Braz J Chem Eng.* 31:683–691.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J-C, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 35:206–221.
- Tsuboy MS, Angeli JPF, Mantovani MS, Knasmüller S, Umbuzeiro GA, Ribeiro LR. 2007. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. *Toxicol In Vitro.* 21:1650–1655.
- Umbuzeiro GA, Freeman HS, Warren SH, de Oliveira DP, Terao Y, Watanabe T, Claxton LD. 2005. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere.* 60:55–64.
- Umbuzeiro GA, Coimbra CA, Kummrow F, Lobo DJA, Saldiva PHN. 2007. Mutagenic activity assessment of Cristais River, São Paulo, Brazil, using the blue rayon/Salmonella microsome and the *Tradescantia pallida* micronuclei assays. *J Braz Soc Ecotoxicol.* 2:163–171.
- Vacchi FI, Vendemiatti JA de S, da Silva BF, Zanoni MVB, Umbuzeiro G de A. 2017. Quantifying the contribution of dyes to the mutagenicity of waters under the influence of textile activities. *Sci Total Environ.* 601–602:230–236.

Vendemiatti JA de S, Moralles DA, Camparotto N, Umbuzeiro GA, Prediger P. 2017. Dinitrophenylazo Dye Derivatives: Synthesis, Characterization and Mutagenicity Evaluation. 18th International Symposium on Toxicity Assessment. Limeira, SP, Brasil. 2:30-33.

Wang XW, Harris CC. 1997. p53 tumor-suppressor gene: Clues to molecular carcinogenesis. *J Cell Physiol.* 173:247-255.

Watanabe T. 2002. Mutagenicity of two 2-phenylbenzotriazole derivatives, 2-[2-(acetylamino)-4-(diethylamino)-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole and 2-[2-(acetylamino)-4-(diallylamino)-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole and their detection in river water in Japan. *Mutagenesis.* 17:293–299.

Watanabe T, Nukaya H, Terao Y, Takahashi Y, Tada A, Takamura T, Sawanishi H, Ohe T, Hirayama T, Sugimura T, Wakabayashi K. 2001. Synthesis of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens, PBTA-5 and PBTA-6, and their detection in river water from Japan. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 498:107–115.

Watanabe T, Ohba H, Asanoma M, Hasei T, Takamura T, Terao Y, Shiozawa T, Hirayama T, Wakabayashi K, Nukaya H. 2006. Isolation and identification of non-chlorinated phenylbenzotriazole (non-CIPBTA)-type mutagens in the Ho River in Shizuoka Prefecture, Japan. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 609:137–145.

Wormhoudt LW, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. 1999. Genetic Polymorphisms of Human N-Acetyltransferase, Cytochrome P450, Glutathione-S-Transferase, and Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to Xenobiotic Metabolism and Toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 29:59–124.

Yeganeh M, Gui Y, Kandhi R, Bobbala D, Tobelaim W-S, Saucier C, Yoshimura A, Ferbeyre G, Ramanathan S, Ilangumaran S. 2016. Suppressor of cytokine signaling 1-dependent regulation of the expression and oncogenic functions of p21CIP1/WAF1 in the liver. *Oncogene.* 35:4200–4211.

Zocolo GJ, Pilon dos Santos G, Vendemiatti J, Vacchi FI, Umbuzeiro G de A, Zanoni MVB. 2015. Using SPE-LC-ESI-MS/MS Analysis to Assess Disperse Dyes in Environmental Water Samples. *J Chromatogr Sci.* 53:1257–1264.

10. ANEXO I

Certificado de aprovação do protocolo do estudo pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Faculdade de Medicina – UNESP – Câmpus de Botucatu.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1254/2017-CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "**Potencial toxicogênico do contaminante ambiental 2-fenilbenzotriazol 9 (PBTA-9) in vivo**", conduzida pela Pesquisadora: Amanda Rodrigues Tanamachi, Orientada pela Profa. Dra. Daisy Maria Favero Salvadori, Coorientada pelo Prof. Dr. Fábio Henrique Fernandes e com a participação do Colaborador: Paulo Cesar Georgete, registrada com o nº 1254/2017, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 30 de novembro de 2017.

Finalidade	() Ensino - (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31/07/2020
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo Heterogên/Swiss
Nº de animais	60
Peso/Idade	08 semanas/35g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNESP - FMB


Graziela Nogueira Bertani
Secretária

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA


Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



Ofício nº 009/2019-CEUA-FMB/UNESP

Botucatu, 18 de janeiro de 2019.

Prezada Senhora,

Em atendimento ao documento protocolado em 06 de novembro de 2018, solicitando alteração do título e também a inclusão de mais 48 camundongos - referente ao Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEUA 1254/2017**) - **Título:** "Potencial toxicogenômico do contaminante ambiental 2- fenilbenzotriazol 9 não clorado (non-CI PBTA-9) IN VIVO", aprovado em 30/11/2017 -, informo que alteração solicitada foi **AUTORIZADA**, ficando na seguinte conformidade.

Título Anterior: "Potencial toxicogenômico do contaminante ambiental - 2-fenilbenzotriazol 9 (PBTA-9) in vivo."

Título Novo: "Potencial toxicogenômico do contaminante ambiental 2- fenilbenzotriazol 9 não clorado (non-CI PBTA-9) in vivo."

Pesquisador Principal atual: Amanda Rodrigues Tanamachi

Orientador: Profa. Dra. Daisy Maria Favero Salvadori

Atenciosamente,

Prof. Ass. Guilherme Antônio Moreira de Barros

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP

Ilustríssima Senhora

Professor Doutora Daisy Maria Favero Salvadori

Departamento de Patologia

Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP