



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Lara Zácari Fanali

**Alterações morfofuncionais nos melanomacrófagos hepáticos de peixes e anfíbios  
induzidas pelo contaminante benzo[a]pireno**

São José do Rio Preto

2020

Lara Zácari Fanali

**Alterações morfofuncionais nos melanomacrófagos hepáticos de peixes e anfíbios  
induzidas pelo contaminante benzo[a]pireno**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP (2017/07971-2)

CAPES

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira

São José do Rio Preto

2020

F199a	<p data-bbox="507 1317 1244 1541">Fanali, Lara Zácari Alterações morfofuncionais nos melanomacrófagos hepáticos de peixes e anfíbios induzidas pelo contaminante benzo[a]pireno / Lara Zácari Fanali. -- São José do Rio Preto, 2020 87 p. : tabs., fotos</p> <p data-bbox="507 1585 1193 1729">Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Classius de Oliveira</p> <p data-bbox="507 1774 1200 1845">1. Ecotoxicologia. 2. Melanomacrófago. 3. Fígado. 4. Anura. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.  
Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Lara Zácari Fanali

**Alterações morfofuncionais nos melanomacrófagos hepáticos de peixes e anfíbios  
induzidas pelo contaminante benzo[a]pireno**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP (2017/07971-2)

CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Classius de Oliveira

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientador

Dr. Juan Manuel Pérez Iglesias

Universidad Nacional de San Luis - Argentina

Profa. Dra. Monica Jones Costa

UFScar - Sorocaba

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

UNICAMP - Campinas

Prof. Dr. Paulo Sergio Martins de Carvalho

UFPE – Recife

São José do Rio Preto

27 de março de 2020

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2017/07971-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## RESUMO

Peixes e anfíbios estão vulneráveis a diversos poluentes. O benzo[a]pireno (BaP) é um contaminante com propriedades tóxicas. Metabolizado pela enzima P450 (CYP1A1), de fase I EROD (Etoxiresorufina-O-deetilase), produz subprodutos tóxicos. Conhecida como um inibidor da CYP1A1,  $\alpha$ -naftoflavona (aNF) impede o metabolismo do BaP e a geração de metabólitos tóxicos. A aNF é um composto exógeno e não se tem conhecimento do efeito dela em órgãos e tecidos. O fígado é a maior fonte de enzimas catalizadoras de reações de biotransformação. A suscetibilidade do órgão a danos por agentes químicos é uma consequência de seu papel no metabolismo. Porém, animais desenvolveram mecanismos para detectar e responder a esses produtos químicos. Melanomacrófagos (MMs) hepáticos são células que contêm melanina e que estão envolvidos nesse processo, devido a sua função de detoxificação. Dessa forma, nossos objetivos foram avaliar os efeitos do BaP e/ou aNF nos MMs e efeitos genotóxicos dos compostos. Os animais foram expostos a 2mg/kg de BaP e/ou 20mg/kg de aNF por 48 horas e 7 dias. Após os experimentos o fígado passou por procedimentos histológicos para quantificação da área de melanina dos MMs e fagocitose na microscopia de luz; microscopia de fluorescência para análise do citoesqueleto dos MMs; espectrofotometria para quantificar a atividade EROD e síntese de melanina dos MMs; e análise genotóxica dos eritrócitos. Em peixes, após 7d houve diminuição da área de melanina, devido a uma inibição do BaP na via melanogênica; agregação dos melanossomos por interferência nos filamentos de actina; e aumento da frequência de micronúcleo, pelo potencial genotóxico do composto. Nos anuros, em 48h, houve aumento da produção de melanina nos tratamentos com BaP, devido ao papel antioxidante da melanina; diminuição da fagocitose, por interferência nessa função; diminuição da síntese de melanina no grupo com BaP + aNF, causada pela toxicidade dos dois compostos; e diminuição das anormalidades eritrocitárias, pela permanência no sangue somente os eritrócitos menos danificados. Em 7d, não houve nenhuma alteração, pois, os organismos atingiram o limite de resposta aos xenobióticos, causado pelo longo período de exposição associado à alta dose dos compostos.

**Palavras-chave:** melanomacrófago, citoesqueleto, alteração morfológica, genotoxicidade.

## ABSTRACT

Fish and amphibians are vulnerable to various pollutants. Benzo[a]pyrene (BaP) is a contaminant with toxic properties. Metabolized by the enzyme P450 (CYP1A1) produces toxic byproducts. Known as a CYP1A1 inhibitor,  $\alpha$ -naphthoflavone (aNF) prevents BaP metabolism and the generation of toxic metabolites. aNF is an exogenous compound and is not known for its effect on organs and tissues. The liver is the major source of catalyzing enzymes for biotransformation reactions. The susceptibility of the organ to damage by chemical agents is a consequence of its role in metabolism. However, animals have developed mechanisms to detect and respond to these chemicals. Melanomacrophages (MMs) are involved in this process due to their detoxification function. Thus, our objectives were to evaluate the effects of BaP and/or aNF on MMs and genotoxic effects of compounds. The animals were exposed to 2mg/kg BaP and/or 20mg/kg aNF for 48 hours and 7 days. After the experiments, the procedures for light microscopy, fluorescence, spectrophotometry and genotoxic analysis were followed. In fish, after 7d there was a decrease in melanin area, due to a inhibition of BaP in the melanogenic pathway; melanosome aggregation by interference in actin filaments; and increased frequency of micronucleus by the genotoxic potential of the compound. In anurans, at 48h, there was an increase in melanin production in BaP treatments, due to the antioxidant role of melanin; decreased phagocytosis by interfering with this function; decreased melanin synthesis in the BaP + aNF group, caused by the toxicity of both compounds; and reduction of abnormalities, by remaining in the blood only the least damaged erythrocytes. At 7d, there was no change, as the organisms have a maximum tolerance level of response to xenobiotics.

**Keywords:** melanomacrophages, cytoskeleton, morphological alteration, genotoxicity.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	8
<b>2. ARTIGO I</b> - Enzymatic, morphological and genotoxic effects of benzo[a]pyrene in <i>Oncorhynchus mykiss</i> (rainbow trout).....	11
<b>Abstract</b> .....	12
<b>Introduction</b> .....	13
<b>Material and methods</b> .....	16
Experiment with benzo[a]pyrene.....	16
EROD assay.....	16
Melanin area quantification .....	17
Cytoskeleton analysis .....	18
Nuclear abnormalities analysis.....	19
Statistical analysis .....	19
<b>Results</b> .....	20
EROD assay.....	20
Melanin area of melanomacrophages .....	22
Cytoskeleton .....	22
<b>Discussion</b> .....	26
<b>Conclusion</b> .....	29
<b>References</b> .....	31
<b>3. ARTIGO II</b> - Curta exposição de <i>Physalaemus cuvieri</i> (Anura) ao contaminante benzo[a]pireno: efeitos morfofuncionais nos melanomacrófagos hepáticos e anormalidades eritrocitárias.....	40
<b>Resumo</b> .....	41
<b>Introdução</b> .....	42
<b>Material e método</b> .....	45
Experimentos com benzo[a]pireno, $\alpha$ -naftoflavona e azul de tripan.....	45
Quantificação da área de melanina.....	46
Quantificação do conteúdo da melanina.....	47
Quantificação da fagocitose.....	47
Análise do citoesqueleto .....	48
Análise de anormalidades nucleares.....	49
Análise estatística .....	49
<b>Resultados</b> .....	50

Efeito do BaP e aNF na produção de melanina .....	50
Efeito do BaP e aNF na área de melanina dos melanomacrófagos .....	51
Efeito do azul de tripan, BaP e aNF nos melanomacrófagos .....	51
Efeito do BaP e aNF no índice da fagocitose .....	52
Efeito do azul de tripan, BaP e aNF nos microtúbulos.....	53
Efeito do azul de tripan, BaP e aNF nos eritrócitos .....	54
<b>Discussão</b> .....	55
<b>Conclusão</b> .....	58
<b>Agradecimentos</b> .....	59
<b>Referências</b> .....	60
<b>4. Artigo III - Interação entre o prócarcinógeno benzo[a]pireno e o flavonoide <math>\alpha</math>-naftoflavona nos melanomacrófagos e eritrócitos de <i>Physalaemus cuvieri</i> (Anura) .....</b>	<b>66</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>67</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>68</b>
<b>Material e método</b> .....	<b>70</b>
Experimentos com benzo[a]pireno e $\alpha$ -naftoflavona .....	70
Quantificação da área de melanina.....	71
Quantificação do conteúdo da melanina.....	72
Análise dos microtúbulos .....	72
Análise de anormalidades nucleares.....	73
Análise estatística .....	73
<b>Resultados</b> .....	<b>74</b>
<b>Discussão</b> .....	<b>76</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>78</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>78</b>
<b>Referências</b> .....	<b>79</b>
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>84</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O fígado tem papel fundamental nos processos de biotransformação e detoxificação de xenobióticos, que, em ectotérmicos, envolvem hepatócitos e células denominadas melanomacrófagos (MMs) (Fenoglio et al., 2005; Bach et al., 2018). Essa célula fagocítica é capaz de produzir e armazenar melanina (Agius and Roberts, 2003; Ribeiro et al., 2011), importante pela sua capacidade de absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes tóxicos (Zuasti et al., 1989).

MMs são capazes de acumular materiais exógenos, de origem natural ou experimental (Steinel and Bolnick, 2017) e também são responsivas a ação de xenobióticos (de Oliveira, 2017; Fanali et al., 2017; 2018; Franco-Belussi et al., 2016; Regnault et al., 2014; 2016). Dessa forma, eles estão envolvidos em processos de detoxificação, devido a uma combinação de biotransformação enzimática e ação antioxidante da melanina (Fenoglio et al., 2005; Bach et al., 2018). Isso lhes confere a capacidade de inativar algumas substâncias citotóxicas por meio das propriedades do biopolímero melânico (Fenoglio et al., 2005; Bach et al., 2018).

Benzo[a]pireno (BaP) é contaminante de alto risco por ser mutagênico, cancerígeno (US EPA, 2014), citotóxico (Zena et al., 2015), teratogênico (Wakx et al., 2016), imunotóxico (US EPA, 2014), hepatotóxico (Fanali et al., 2018), neurotóxico (Gao et al., 2015), genotóxico (Pastore et al., 2014) e atua como desregulador endócrino (Regnault et al., 2014, 2016). Ele pertence à classe dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), substâncias bastante estudadas em virtude de sua toxicidade e persistência no ambiente (Brandt et al., 2002).

BaP é produzido e liberado na atmosfera em grandes quantidades pelo processo de combustão (Bauer et al., 1995), dessa forma pode ser adsorvido por partículas em suspensão no ar (Srogi, 2007), mas também por partículas presentes na água (WHO

1998), no solo e em sedimentos (Stark et al., 2003; Morillo et al., 2008a; Harris et al., 2011). Além do mais, é uma substância com potencial biocumulativo em peixes e anuros (Connel, 1990; Brandt et al., 2002).

A exposição ao BaP resulta na ativação do receptor de hidrocarboneto aril (AhR) e aumento da expressão da proteína CYP1A1 e da sua atividade enzimática (Hodek et al., 2013), a fim de metabolizar o composto (Madureira et al., 2014). A metabolização do BaP ocorre a partir de uma série de reações de oxidação (fase I) convertendo compostos orgânicos relativamente insolúveis em substâncias mais solúveis em água. Os produtos de oxidação primária resultantes das reações de fase II são então excretados ou posteriormente transformados em produtos de maior solubilidade em água por enzimas de fase II conjugadas (Lemaire et al., 1990). Porém, essa biotransformação gera subprodutos tóxicos e potenciais carcinogênicos (Madureira et al., 2014).

Para prevenir a ativação de carcinogênicos, os chamados compostos quimiopreventivos são frequentemente usados para inibir reações mediadas pela CYP. (Hodek et al., 2009). Sabe-se que a  $\alpha$ -naftoflavona (aNF) ou 7,8-benzoflavona representa um inibidor bem documentado de reações metabólicas mediadas por CYPs da subfamília 1A (CYP1A1) (Bauer et al., 1995; Hodek et al., 2009; 2014), por ligação competitiva ao receptor AhR (Koley et al., 1997).

Portanto, nossos objetivos foram avaliar os efeitos do BaP e da aNF nos melanomacrófagos hepáticos, bem como a genotoxicidade dos compostos. Para o estudo utilizamos a espécie *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), modelo de espécie de peixe empregada em vários estudos, como pesquisas de atividade metabólica e citotoxicidade (Laville et al., 2004; Schreer et al., 2005; Ellesat et al., 2010). Enquanto *Physalaemus cuvieri* foi escolhido por ser uma espécie abundante no Brasil e alvo de estudos

ecotoxicológicos (de Oliveira et al., 2017; Fanali et al., 2017; 2018; da Costa Araújo et al., 2020).

A tese foi dividida em três capítulos em que analisamos o efeito de contaminante na área e síntese de melanina dos MMs hepáticos, na fagocitose dessas células e no citoesqueleto. Analisamos também anormalidades eritrocitárias decorrentes da exposição ao contaminante.

No primeiro capítulo, apresentamos um trabalho paralelo decorrente de estágio no exterior, na Universidade de Gotemburgo. A escolha dele para iniciar a tese se deve ao fato de uma análise adicional, da enzima etoxirresorufina-O-desetilase (EROD), utilizada para detectar a presença de HPAs, como o BaP, composto utilizado nos outros dois capítulos.

As análises do citoesqueleto também foram realizadas na Universidade de Gotemburgo, com um adicional, a análise dos filamentos de actina (não somente microtúbulos), que não foram possíveis realizar nos anuros devido a um erro metodológico que desconhecíamos, mas que foi possível corrigir com as trutas, pois os experimentos com peixes foram todos realizados no exterior, enquanto o material de anuro já foi levado fixado nas lâminas. A intenção do estágio sanduíche era somente fazer a análise do citoesqueleto dos anuros, porém aproveitamos a oportunidade de realizar os experimentos com peixes e análises dos MMs e eritrócitos.

Os outros dois capítulos da tese foram conduzidos com anuros e além de testarmos os efeitos do benzo[a]pireno, testamos também o efeito da  $\alpha$ -naftoflavona nos MMs hepáticos e eritrócitos. Estudo que se justifica pelo fato de tentarmos entender mais a fundo como o BaP influencia na resposta dos MMs.

## 2. ARTIGO I

Enzymatic, morphological and genotoxic effects of benzo[a]pyrene in *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout)

**Lara Zácari Fanali<sup>1</sup>, Classius de Oliveira<sup>2</sup>, Joachim Sturve<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Graduate Program in Animal Biology, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil

<sup>2</sup>Department of Biology, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil

<sup>3</sup>Department of Biological and Environmental Sciences, University of Gothenburg, Göteborg 405 30, Box 463, Sweden

Corresponding author:

Lara Zácari Fanali,

Department of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054-000. Tel.: +55 17 3221-2387. Telefax: +5517 3221-2390. Email: [lara\\_zacari@hotmail.com](mailto:lara_zacari@hotmail.com)

**Abstract**

Benzo[a]pyrene (BaP) is a contaminant that in biotransformation processes leads to activation of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) enzyme and formation of toxic byproducts. Fish have defense systems capable to repair damages caused by xenobiotics. Melanomacrophages (MMs), cells that produce and store melanin are involved in defense because of its detoxification function. Melanin present in MMs is composed by melanosomes, which have the ability to aggregate and disperse through the cytoskeleton. Both MMs and cytoskeleton are responsive to the action of xenobiotics, as well as the formation of erythrocytic nuclear abnormalities. Then, the aims of this study were to identify BaP toxicity in MMs cytoskeleton; evaluate the melanin area occupied in MMs and analyze genotoxicity by erythrocytes abnormalities. For this, juveniles of *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) (n=24) received every 48h intraperitoneal injections with 2 mg/kg BaP dissolved in peanut oil for 48h and 7d while control group received only peanut oil. After the experiment, the animals were euthanized and the weight and length was recorded. Then, we collected blood, removed the liver and followed with analysis procedures to EROD activity, MMs melanin area quantification, melanosomes aggregation/dispersion and genotoxicity test measured by erythrocytes abnormalities. The results showed an increase in EROD activity in 48h and 7d BaP exposure. At 7d we also had decrease in MMs pigmented area, melanosomes aggregation and increase in micronucleus frequency. By EROD assay we confirm that biotransformation system is being activated. Toxic byproducts formed during BaP metabolism can be related to impair the melanosomes movements and consequently the melanin area, factors that may interfere with the MMs detoxification function. In addition to this cytotoxicity, the increase in micronucleus frequency also indicates the genotoxicity of BaP to rainbow trout.

**Keywords:** cytoskeleton, melanomacrophage, EROD assay, morphological alteration.

## **Introduction**

Benzo[a]pyrene (BaP) is a hepatotoxic (Fanali et al., 2018; Pastore et al., 2014; Regnault et al. 2014, 2016) and genotoxic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) (Mouchet et al., 2005; Fanali et al., 2018), substances widely studied due to their bioconcentration capacity (Connel, 1990; Logan, 2007), wide distribution (Douben, 2003; Head et al., 2015), toxicity (Brandt et al., 2002; Head et al., 2015; Santana et al., 2018) and persistence in the environment (Brandt et al., 2002; Collier et al., 2013).

PAHs are originated from incomplete combustion of carbonaceous materials by humans for energy and other industrial processes (Curtis et al., 2011) as the combustion of fossil fuels, petroleum spills, industrial effluents (Whyte et al., 2000; Santana et al., 2018). Although there are natural sources of PAHs, such as forest fires and natural petroleum sources, the main source of contamination is anthropogenic (Whyte et al., 2000; Santana et al., 2018). Fish and other aquatic organisms are exposed to PAHs through the gill in respiration, gut (ingestion) or integument (dermal contact) (Logan, 2007).

In the metabolization of lipophilic xenobiotics such as BaP, the formation of water-soluble and less toxic products is expected (Goksøyr and Förlin, 1992; Bonacci et al., 2003). However, during hepatic biotransformation processes, mainly catalysed by the enzyme cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) (Caruso and Alaburda, 2008; Wakx et al., 2016), more toxic byproducts such as 7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetra (a) pyrene (BPDE) may be formed (Madureira et al., 2014).

Aquatic organisms have molecular and cellular defense systems such as detoxifying enzymes and molecules to protect themselves against the harmful xenobiotics effects (Sturve et al., 2014). Any cellular or molecular damage that may occur as a result of exposure, are often used in monitoring and assessment programs addressing the

environmental impact of pollutants (van der Oost et al., 2003; Sturve et al., 2014). Interactions among pollutants and biochemical and physiological functions in fish, which result in organ-to-subcellular level disturbances are designated biomarkers and can be used as warning signs, indicating possible alterations in reproduction success, growth, or survival of the fish (Forlin et al., 1986; Haux and Forlin, 1988; Sturve et al., 2014).

Biological responses to PAHs toxicity can be evaluated by measuring the induction of hepatic CYP1A activity. CYP1A expression is induced through the Ah receptor that binds dioxin like compounds, planar PCBs and certain PAHs (Goksøyr and Forlin, 1992; Abrahamson et al., 2007; Sturve et al., 2014), CYP1A activity can be measured as ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity, a technique broadly used in fish species (Goksøyr and Forlin, 1992; Bend, 1994; Bargagli et al., 1998; Whyte et al., 2000; Bonacci et al., 2003; Sturve et al., 2014). Thus, EROD activity serves as a sensitive biomarker for Ah receptor ligands, such as PAHs including BaP - (Pacheco and Santos, 1998; Whyte et al., 2000).

Melanomacrophages (MMs) are hepatic phagocytic macrophage present in fish, amphibians and reptiles (Fenoglio et al., 2005; Bach et al., 2018; Wolke, 1992; Fournie et al., 2001; Loumbourdis and Vogiatzis, 2002; Fishelson, 2006) that produce and store melanin (Agius and Roberts, 2003; Ribeiro et al., 2011), that is important for its antioxidant action (Fenoglio et al., 2005; Bach et al., 2018). Melanin neutralizes free radicals, cations and other toxic agents produced during the degradation of phagocytosed cell material (Zuasti et al., 1989). The MMs' melanin production is performed by the melanosome (Sichel et al., 1997), an organelle that contains melanogenic enzymes, i.e. are capable of producing melanin (Colombo et al., 2011).

MMs are able to accumulate within themselves exogenous materials of natural or experimental origin (Steinel and Bolnick, 2017) and are also responsive to the action of

xenobiotics (de Oliveira 2017; Fanali et al., 2017, 2018; Franco-Belussi et al., 2016 Regnault et al., 2014, 2016). Thus, these cells are involved in detoxification processes, due to a combination of enzymatic biotransformation and melanin antioxidant function (Fenoglio et al., 2005; Bach et al., 2018). This gives them the ability to inactivate some cytotoxic substances through the melanic biopolymer (Fenoglio et al., 2005; Bach et al., 2018)

Pigment cells are excellent models to study organelle transport as they specialize in the translocation of pigment granules in response to specific chemical signals (Aspengren et al., 2006). Toxicological effects in the cytoskeletal components like microtubules and actin filaments were previously studied in pigmented cells called melanophores, seen that these components are evolutionary well-conserved (Aspengren et al., 2006, 2012; Hedberg and Wallin, 2010). However, for the first time we are using MMs cytoskeleton to study the effect of the contaminant in the melanosomes movement.

Environmental stressors and contaminants are able to impair the cytoskeleton, thus compromising the aggregation and dispersion of melanin granules (Aspengren et al., 2006, 2008; Hedberg and Wallin 2010). In MMs, the consequence of the impairment of the movement of melanosomes is to hinder the detoxification function of this cellular type, due to compromised cellular integrity. Besides these harmful effects, genotoxic substances like BaP can induce damage to the genetic material in the cells through interactions with the DNA structure and sequence (Kaur et al., 2018), which may result in micronucleus formation (Kaur et al., 2018) and other nuclear erythrocytes abnormalities (Pacheco and Santos, 1998; Peixoto et al., 2019).

The *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) used in this study has been used as model fish species in several studies, including their cells, in research for metabolic activity and cytotoxicity (Laville et al., 2004; Schreer et al., 2005; Ellesat et al., 2010). In

this sense, according to the hypothesis that BaP alters the cytoskeleton and this may impair the movement of melanosomes of MMs and having knowledge of the compound's toxicity, our objectives were to show by EROD assay the activation of biotransformation system of BaP; identify toxicity of BaP in the cytoskeleton; evaluate the MMs melanin area to infer how the compound can affect cell functionality; analyze genotoxicity by erythrocytes abnormalities (anucleate, binucleated, micronucleus and bud).

## **Material and methods**

### Experiment with benzo[a]pyrene

Juveniles of *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) (n=24) with an average weight of 70 g and 190 mm, originating from Vänneåns Laxodling, Halmstad, Sweden, were used for the exposure experiments with benzo[a]pyrene (Sigma Aldrich, St Louis) in 2 experimental times: 48 hours and 7 days in order to test acute effects. The animals were kept under a natural night and daylight regime in glass aquariums without feed. Each animal received 2mg/kg BaP, which was injected intraperitoneally every 48 hours (a total of 3 injections). Control group received peanut oil, the same used to dissolve BaP. We based the concentration on the article by Padrós et al. (2003) with adaptations.

At the end of the experiment, the animals were euthanized with a blow to the head and the weight and length was recorded. Blood was collected from the caudal vein and the liver excised. The liver was shock frozen on liquid nitrogen and stored in liquid nitrogen until analysis. Animal experiments were conducted according to Swedish ethics guidelines in accordance with the Ethics permit 15986-2018.

### EROD assay

Livers were homogenized in cold homogenizing buffer (0.1 M Na/P -phosphate buffer containing 0.15 M KCl, pH 7.4). The homogenate was centrifuged at 10,000g for 20 min at 4 °C. Then, we collected the supernatant and S9 fraction produced in this step was processed to microsomes with an additional centrifugation 100,000g for 60 min at 4 °C. After centrifugation, the supernatant (cytosol) was stored at -80 °C until use. To the pellet (microsomes) produced we added cold homogenizing buffer containing 20% glycerol. It was homogenized to a smooth solution and stored at -80 °C.

To measure the activity we used a spectrofluorometer and Felix Gx program (version 4.3.2). First, a Rhodamin B calibration series was used as standard. To measure samples, in a cuvette we added to the microsomal fraction of the sample: EROD buffer-ethoxyresorufin mix (0.1 M Na-phosphate solution, pH 8.0) and NADPH, used to start the reaction.

EROD activity was expressed as picomoles of resorufin formed per minute and per milligram of protein (pmol/min/mg protein). For this, protein content was quantified according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

#### Melanin area quantification

For histological analysis, liver fragments was fixed in Metacarn (60% methanol, 30% chloroform, 10% acetic acid) for 3 hours, dehydrated in alcoholic series and sent to Histocenter Company to finish the procedures. They embedded in paraffin and stained with Hematoxylin-Eosin. We took 25 random pictures of each animal under a light microscope with an image capture system and performed the quantification of the pigmented area by the difference in color intensity of melanomacrophages (Santos et al., 2014), using Image Pro-Plus program (version 6.0).

### Cytoskeleton analysis

Liver fragments were frozen at -20 °C and then 2 ml with 20 mM EDTA for 24 to 48 hours at 4 °C was used to dissociate the liver cells and separate melanomacrophages. This step allows the cells to be dissociated by mechanical action of continuous suctioning of the contents. Then, the content was centrifuged at 1,500g for 10 min at 4 °C for pellet formation. Pellets containing melanomacrophages were added to KCl (0.56% w / v) for 20min, mixed for 10s to suspend the pellet which was then placed on the slide.

For microtubules immunostaining cells were fixed in ice methanol for 6 min and then washed 3x for 5 min with PBS (phosphate buffered saline) before incubation with the primary antibody Rabbit polyclonal to beta tubulin - Loading control (Abcam) for 60 min at room temperature. The cells were then washed 3x for 5 min with PBS and incubated in darkness with the secondary antibody Goat polyclonal secondary antibody to rabbit IgG - H&L (Alexa Fluor® 488) (Abcam) for 45 min followed by 3x for 5 min washes with PBS and a final rinse in miliQ water to avoid salt crystals before they were allowed to dry (Hedberg and Wallin, 2010).

For actin filaments cells were briefly rinsed in PBS, fixed in 3.7% formaldehyde solution for 10 min, washed 2x with PBS, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min. The slides were then washed again 2x for 5 min in PBS, and blocked with 1% BSA for 20 min. The cells were then stained with Rhodamine-Phalloidin (Thermo-Fisher) for 20 min, washed 3x for 5 min in PBS, rinse in miliQ water and allowed to dry (Hedberg and Wallin, 2010).

We counted 50 cells per animal under a Nikon Eclipse E100 fluorescence microscope, using the ACT-1 (version 2.0) program and quantification was made by the measurement of the fluorescent cell area, using Image Pro-Plus program (version 6.0).

### Nuclear abnormalities analysis

After euthanized, blood was collected by caudal vein with heparinized syringe and needle, dripped onto the slide and blood smears were made. After drying, they were fixed in methanol for 20 min and stained with Giemsa 7.5%, for 30 min. The following nuclear abnormalities in erythrocytes were measured: anucleate, binucleated, bud and micronucleus. For each animal, 1000 erythrocytes were counted (Pérez-Iglesias et al., 2014).

### Statistical analysis

Our experimental design had two treatments (control and one BaP concentration) and two exposure times (48 hours and 7 days), that is, a 2 x 2 factorial design. Per treatment, we used 6 animals to quantify EROD, cytoskeleton, melanomacrophages and erythrocytes abnormalities.

A Kruskal-Wallis test was applied in EROD assay to determine whether significant differences among the groups, since the data did not have normal distribution.

A Linear Mixed-Effects Model (package lme4; Bates et al., 2015) (Zuur et al., 2009) with restricted maximum likelihood (REML; Bolker et al., 2009) with treatment and time of exposure as fixed factors, along with their interaction was applied to model microtubules, actin filaments and melanomacrophages area, the continuous responses variables. The sampling units (cells for microtubules and actin filaments; pictures for melanomacrophage area), in which we estimated our response variables, were nested within each animal (true replicate). To control the dependency among the 50 cells or 25 pictures from the same animal (Crawley, 2012: 703), we included a random intercept for animal (categorical with 6 levels; Moen et al., 2016). To test model assumptions we used diagnostic plots with the R package sjPlot (Lüdtke, 2016) and to assess for differences

between treatment and exposure time we used least-squares means with R package lsmeans (Lenth, 2016). The data of microtubules analysis were log-transformed in order to attend the assumption of normality and homogeneity. Then, the statistical models were summarized and, as suggested by Kenward and Roger (1997), P values were estimated based on conditional F-tests, with the approximations of the degrees of freedom being made with the aid of the sjPlot.

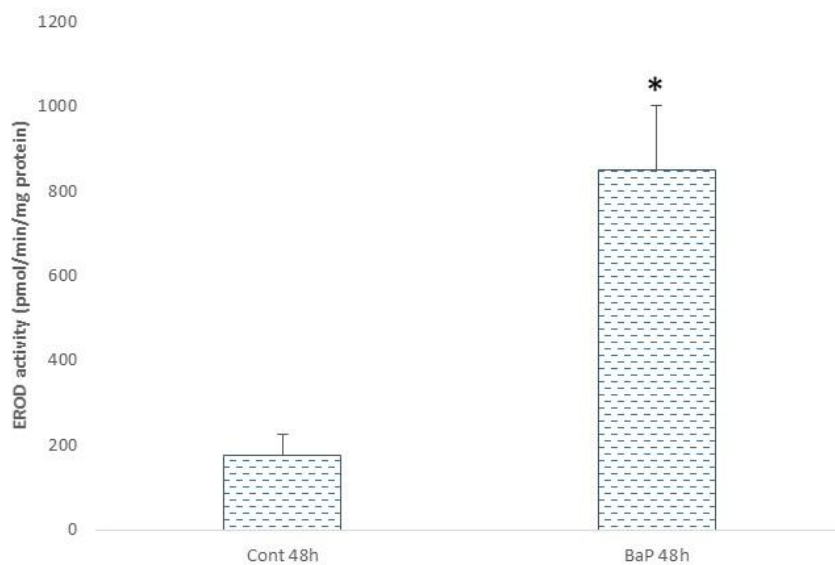
A Generalized Linear Model (GLM) was used to model the erythrocytes abnormalities. A binomial distribution and log link function included treatment and exposure time, along their interactions. To test model assumptions we used diagnostic plots from the R (Team Core, 2016) sjPlot package (Lüdtcke, 2016).

All analysis were performed using software R v. 3.3.2 (R Core Team, 2016).

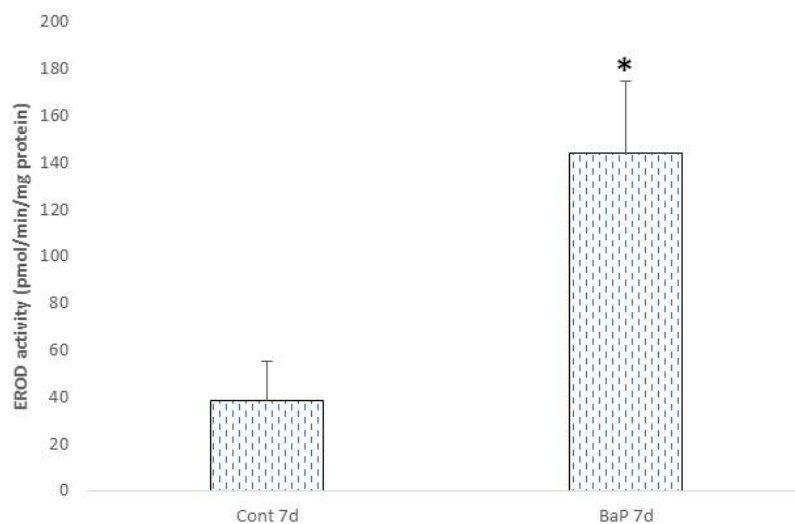
## **Results**

### EROD assay

In both experimental times of 48 hours and 7 days it was possible to see significant difference in EROD activity. In 48 hours the increase in the activity reached 3.835x ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1) and in 7 days reached 2.747x ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).



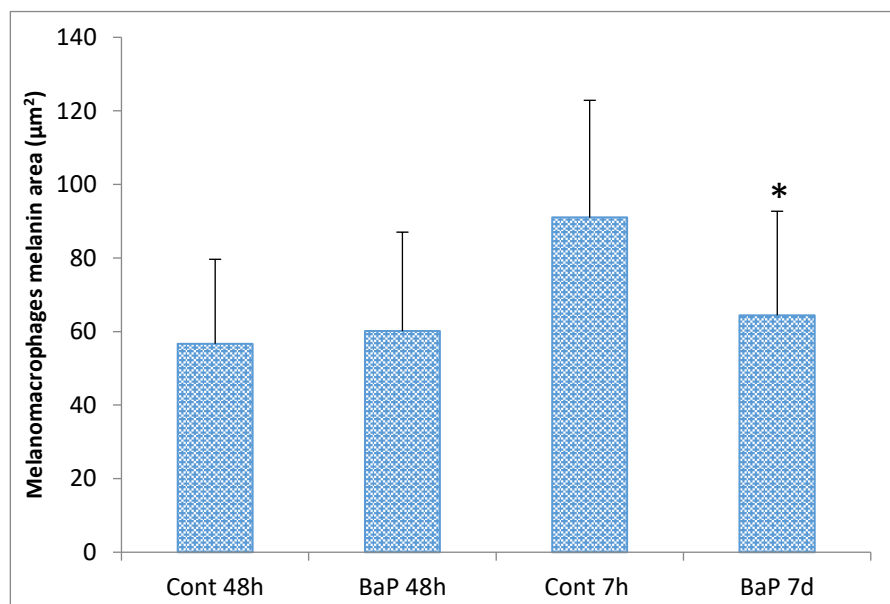
**Figure 1.** EROD activity in *Oncorhynchus mykiss* exposed to 2mg/kg of benzo[a]pyrene in experimental time of 48 hours (48h). The asterisk (\*) represents significant difference between control and treatment ( $P<0.05$ ). **Cont** = peanut oil, **BaP** = benzo[a]pyrene. Fonte: Elaborado pelo autor.



**Figure 2.** EROD activity in *Oncorhynchus mykiss* exposed to 2mg/kg of benzo[a]pyrene in experimental time of 7 days (7d). The asterisk (\*) represents significant difference between control and treatment ( $P<0.05$ ). **Cont** = peanut oil, **BaP** = benzo[a]pyrene. Fonte: Elaborado pelo autor.

### Melanin area of melanomacrophages

After 48h of exposure we did not see effects of BaP in the melanin area of melanomacrophages ( $p>0.05$ ). At 7 days of treatment, the melanin area of melanomacrophages reduced from  $91.0 \pm 31.9$  to  $64.4 \pm 28.3$ . This represents a drop of 29.2% ( $F=0.8965$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 3).

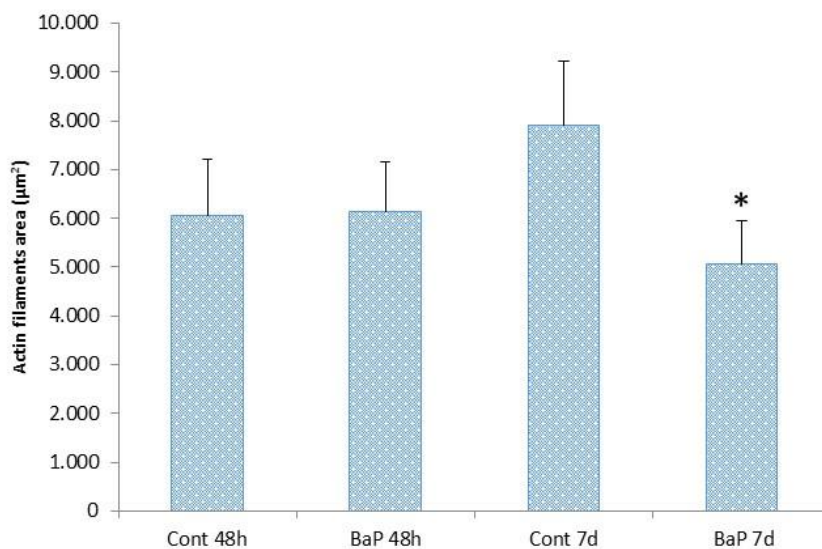


**Figure 3.** Melanomacrophages melanin area in *Oncorhynchus mykiss* exposed to 2mg/kg of benzo[a]pyrene in experimental times of 48 hours (48h) and 7 days (7d). The asterisk (\*) represents significant difference among treatments ( $P<0.05$ ). **Cont** = mineral oil, **BaP** = benzo[a]pyrene. Fonte: Elaborado pelo autor.

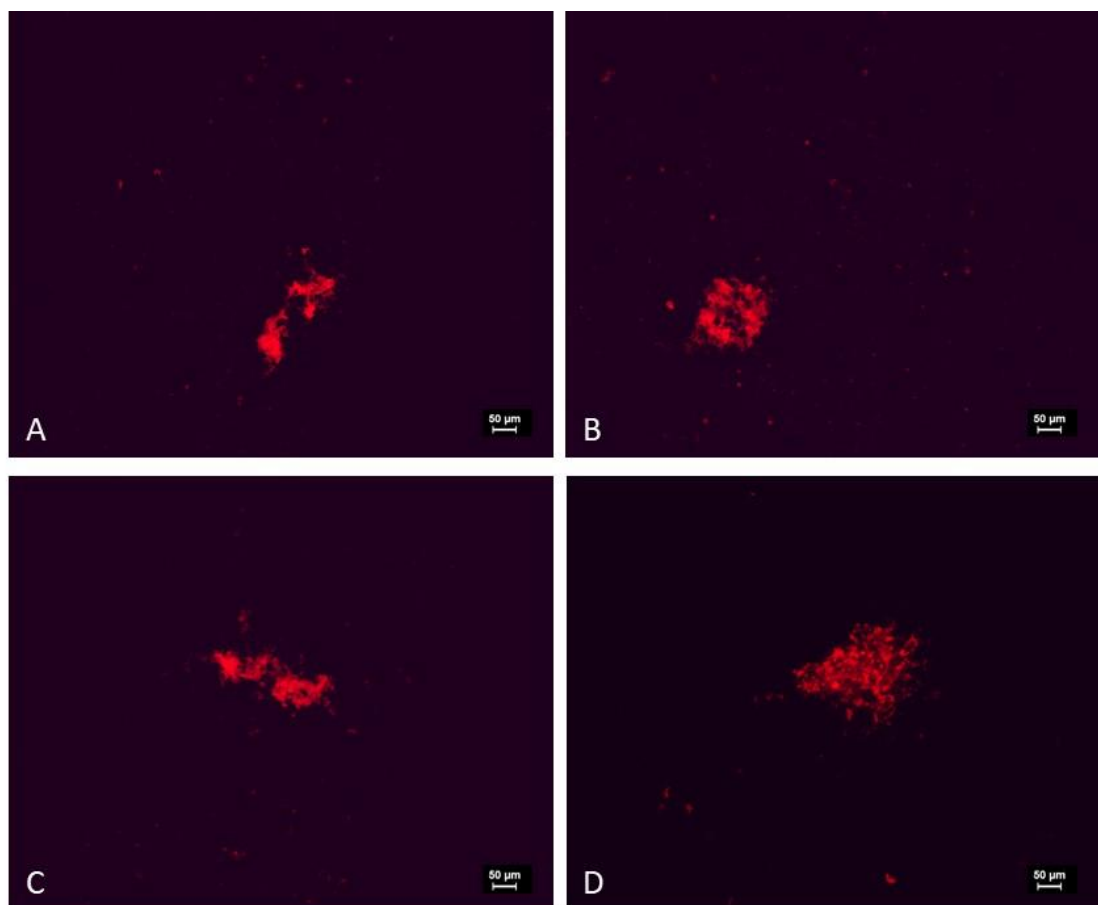
### Cytoskeleton

After 48h of exposure we did not see effects of BaP in actin filaments ( $p>0.05$ ). At 7 days of exposure, the fluorescence area corresponding to the marking of actin filaments decreased from  $7915.9 \pm 1305.9$  to  $5058.0 \pm 901.1$ , that is, the melanin granules were 36.1% ( $F = 26.0756$ ,  $p<0.01$ ) more aggregated in the treated group than in control (Figs. 4-5).

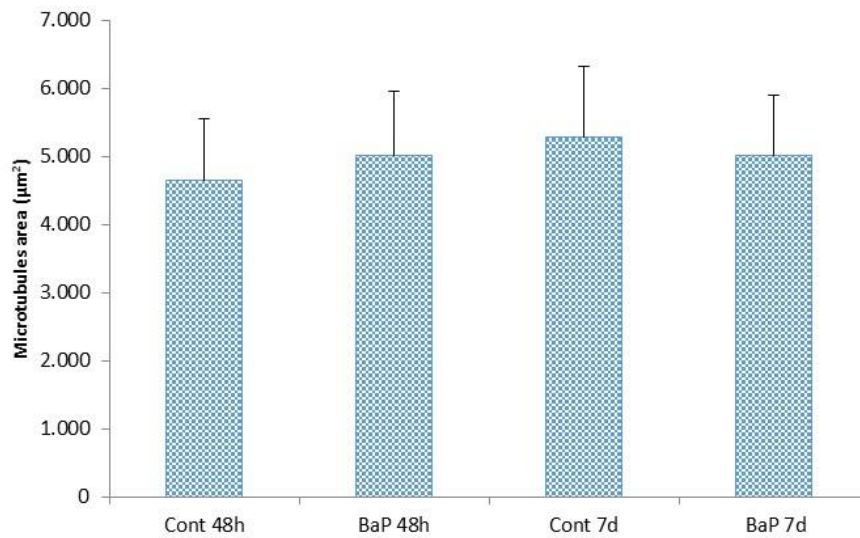
In relation to microtubules, we did not find significant differences among the groups ( $p>0.05$ ) (Figs. 6-7).



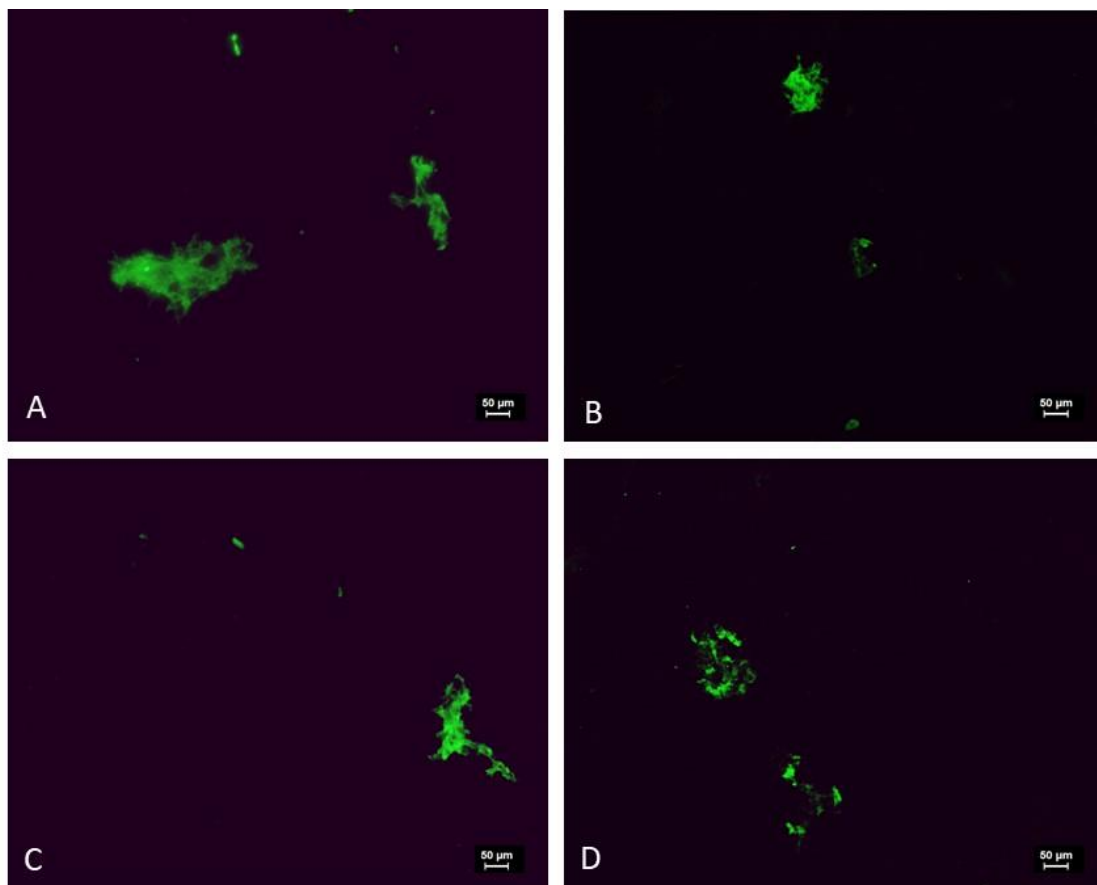
**Figure 4.** Demarcated area of actin filaments in *Oncorhynchus mykiss* exposed to 2mg/kg of benzo[a]pyrene in experimental times of 48 hours (48h) and 7 days (7d). The asterisk (\*) represents significant difference among treatments ( $P < 0.05$ ). **Cont** = peanut oil, **BaP** = benzo[a]pyrene. Fonte: Elaborado pelo autor.



**Figure 5.** Fluorescence of *Oncorhynchus mykiss* showing melanomacrophages actin filaments. **A and C:** aggregated melanosomes; **B and D:** dispersed melanosomes. Scale bar: 50 µm. Fonte: Elaborado pelo autor.



**Figure 6.** Demarcated area of microtubules in *Oncorhynchus mykiss* exposed to 2mg/kg of benzo[a]pyrene in experimental times of 48 hours (48h) and 7 days (7d). No statistical differences were found ( $P>0.05$ ). **Cont** = peanut oil, **BaP** = benzo[a]pyrene. Fonte: Elaborado pelo autor.



**Figure 7.** Immunofluorescence of *Oncorhynchus mykiss* showing melanomacrophages microtubules. **A:** dispersed (left side) and aggregated (right side) melanosomes; **B:** dispersed melanosomes; **C:** aggregated melanosomes; **D:** dispersed (left side) and aggregated (right side) melanosomes. Scale bar: 50 µm. Fonte: Elaborado pelo autor.

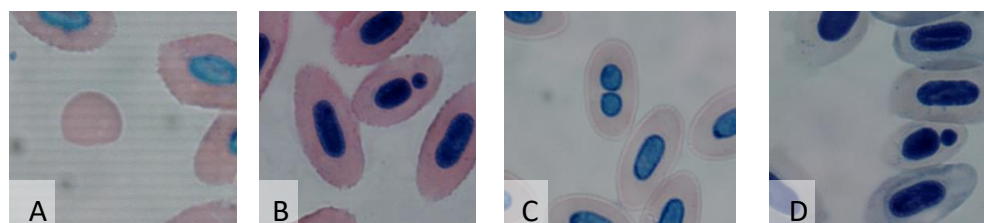
## Nuclear Abnormalities

We did not observe effects of BaP after 48h. We could observe a 30% ( $p < 0.05$ ) increase in micronucleus frequency after 7 days of treatment (see Table 1, Fig. 8).

**Table 1.** Nuclear abnormalities found in erythrocytes of *Rainbow trout* exposed to 2mg/kg of benzo[a]pyrene.

	Anucleate	Micronucleus	Binucleated	Bud	Total Abnorm.
Cont 48h	$0.3 \pm 0.3$	$0.6 \pm 0.3$	$0.5 \pm 0.5$	$0.3 \pm 0.3$	$0.4 \pm 0.3$
BaP 48h	$0.5 \pm 0.5$	$1.1 \pm 0.4$	$0.3 \pm 0.2$	$0.6 \pm 0.3$	$0.6 \pm 0.3$
Cont 7d	$1.0 \pm 0.5$	$0.5 \pm 0.2$	$0.8 \pm 0.4$	$1.0 \pm 0.4$	$0.8 \pm 0.4$
BaP 7d	$0.5 \pm 0.3$	$2.0 \pm 0.5^*$	$0.6 \pm 0.4$	$0.8 \pm 0.5$	$1.0 \pm 0.5$

Significant differences between control and treated groups are shown with the asterisk (\*).  $P < 0.05$ . Fonte: Elaborada pelo autor.



**Figure 8.** *Oncorhynchus mykiss* erythrocytes showing: **A:** anucleate, **B:** Micronucleus, **C:** binucleated, **D:** Bud. Fonte: Elaborado pelo autor.

## Discussion

Results from the present study show that EROD activity was increased in the BaP exposed animals, possibly due to an induction of CYP1a. These results are supported by earlier studies. *Oryzias latipes* exposed to 0.5 and 5  $\mu\text{g}$  BaP for 48 hours had an increase in EROD activity (Pannetier et al., 2019). Studies with flounder and rainbow trout had the same response after 20 days of exposure with 10 and 50 mg/kg BaP (Malmström et al., 2004). Eelpout exposed to three different doses of oil (derived from PAHs) (10, 100,

and 1,000 µg/L) showed increase in EROD activity too (Sturve et al., 2014). Curtis et al. (2011) showed an increase in hepatic microsomal EROD activity after 3 and 14 days in rainbow trout exposed to 3 µg BaP/g fish/day. Ethoxyresorufin O-deethylase is characterized to be sensitive to induction by chemical pollutants like PAHs (Pacheco and Santos, 1998). BaP binds to the Ah receptor, which is translocated to the nucleus, where the transcription of CYP1A, enzyme responsible for EROD activity, occurs (Whyte et al., 2000). Therefore, the increase in EROD activity demonstrates that BaP is being metabolized and its byproducts may be the cause of cellular damages.

At 7 days of BaP exposure, the melanosomes of melanomacrophages were more aggregated, according to the smaller area marked by actin filaments. Furthermore, the melanin area in melanomacrophages decreased. The basic principle for the intracellular transport of melanosomes is the use of microtubules and actin filaments, cytoskeletal components, as a molecular engine on melanosomes, and the presence of the kinesin and dynein proteins, as a mode for transporting (Alberts et al., 2002). The cytoplasmic protein dynein, is involved with the movement of melanosomes by microtubules, towards the nuclei, while kinesin disperses the granules throughout microtubules (Bagnara and Matsumoto, 2006; Sköld et al., 2002, 2016).

In *Xenopus laevis* anuran, the removal of actin filaments from melanophores inhibits dispersion of melanosomes (Aspengren et al., 2006; McGuire et al., 1972), and the filaments are essential for pigment dispersion in these cells (Rogers et al. 1999). Actin filaments may be disrupted in dispersed melanophores, and when this happen the melanosomes aggregate in cell center (Rogers et al. 1998, 1999; Aspengren et al., 2006). Drugs are also capable of inducing pigment aggregation in consequence of actin disruption (Koyama and Takeuchi, 1980; Aspengren et al., 2008).

Although in anurans the rupture of the actin filaments causes aggregation of the pigments, in fish the opposite happens (Sköld et al., 2002; Aspengren et al., 2008). However, the motor protein kinesin, that is involved in fish melanosome dispersion (Rodionov et al., 1991) is regulated and activated by the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signal cascade (Sköld et al., 2002), a second messenger responsible for regulating pigment translocation in most melanophores (Tuma and Gelfand, 1999). Low levels of cAMP lead to kinesin motor inactivation and cell aggregation (Rozdzial and Haimo, 1986; Sammak et al., 1992; Sköld et al., 2002). Yeo et al. (2017) reported that BaP administration decreased cAMP levels in tumors with adjacent lung tissues. In our study, BaP may have triggered a similar response to low levels of cAMP, which prevented kinesin activation and kept melanosomes from melanomacrophages aggregated. Another hypothesis is that BaP may have inhibited another motor protein, the myosin-Va, because detachment of this protein facilitate aggregation (Aspengren et al., 2008).

In relation to decrease in the melanin area of melanomacrophages, Pronina et al. (2014) found similar results in *Rutilus rutilus* fish from a contaminated lake with cyanobacteria microcystin, while Payne and Fancey (1989) observed a decrease in the number of MMs in the liver of *Pseudopleuronectes americanus* fish kept in aquarium with high levels of PAHs. *Hypsiboas albopunctatus* anurans exposed to 7 mg/kg BaP for 3 days (Fanali et al., 2017) and *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* anurans exposed to 2 mg/kg BaP for 7 days (Fanali et al., 2018) showed the same decreased in melanin area.

According to Joo et al. (2015), BaP inhibits the tyrosinase activity. This enzyme regulates melanogenesis, which is induced by the melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) (Park et al., 2009; Videira et al., 2013), which leads to decreased melanin synthesis in melanoma mouse cells (Joo et al., 2015). Another explanation is based on the results

obtained in this study with rainbow trout where we could observe the aggregation of melanin in the cell center, which may have triggered the decrease of the pigmented area of the MMs. Therefore, BaP may be influencing the melanogenic pathway of MMs, but we also have indications that the contaminant is acting on the cytoskeleton and generating this type of response.

Another negative aspect triggered by BaP was the increase in micronucleus frequency after 7 days of initial exposure. Micronuclei (MN) is formed from chromosomal fragments or whole chromosomes during cell division due to absence or damage to the centromere, or defect in cytokinesis. When these fragments left behind are incorporated in the secondary nuclei we have a micronuclei that can occur in any cell in division process of any species (Kaur et al., 2018). Micronuclei test is widely applied methods since it allows a convenient, sensitive and easy application, in particular in genotoxicological studies with aquatic organisms (Kaur et al., 2018). MN frequency increased in brown trout (*Salmo trutta fario*) from the contaminated river (Hariri et al., 2018). In MN assay with the rainbow trout liver cell line RTLW1 revealed that carbazole, acridine and dibenzothiophene, all of them PAH, had genotoxic impact (Brinkmann et al., 2014). In *Oreochromis niloticus* exposed to nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs), MN frequencies were significantly higher in the exposure groups after 7 and 14 days (Bacolod et al., 2017). Anurans (*Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus*) treated with 2mg/kg BaP after 7 days, same in this study, had MN frequency increased (Fanali et al., 2018). This context confirm the damage to the genetic material and BaP genotoxic potencial.

## **Conclusion**

Seen that BaP induced changes in melanomacrophages actin filaments and this can impair the melanin and consequently, melanomacrophage function, and because of

the increase in micronucleus frequency we affirm that this contaminant is cytotoxic and genotoxic to *O. mykiss*.

### **Acknowledgment**

The authors thank Margareta Wallin for the assistance with the cytoskeleton methodology and text revision. This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grants #2013/02067-5 and #2018/01078-7). CO has been continuously supported by CNPq (fellowships #305081/2015-2 and #304552/2019-4). Thanks also to FAPESP for BEPE fellowship (2018/07989-1) to LZF.

## References

- Abrahamson, A., Andersson, C., Jönsson, M. E., Fogelberg, O., Örberg, J., Brunström, B., & Brandt, I. (2007). Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish—A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala waters. *Aquat Toxicol*, 85(1), 1–8.
- Agius, C., Roberts, R. J. (2003). Review: Melano-Macrophage Centres and their Role in Fish Pathology. *J Fish Biol*, 26, 499-509.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science, p1616.
- Aspengren, S., Hedberg, D., Sköld, H. N., & Wallin, M. (2008). New insights into melanosome transport in vertebrate pigment cells. *Int Rev Cell Mol Biol*, 272, 245-302.
- Aspengren, S., Norström, E., and Wallin, M. (2012). Effects of hydroquinone on cytoskeletal organization and intracellular transport in cultured *Xenopus laevis* melanophores and fibroblasts. *ISRN Cell Biol*, 2012, 1–8.
- Aspengren, S., Wielbass, L., and Wallin, M. (2006). Effects of acrylamide, latrunculin, and nocodazole on intracellular transport and cytoskeletal organization in melanophores. *Cell Motil Cytoskel*, 63, 423–436.
- Bach, N. C., Marino, D. J., Natale, G. S., & Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289-297.
- Bacolod E. T., Uno S., Villamor S. S., Koyama J. (2017). Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to environmental concentration of 1-nitropyrene. *Mar Pollut Bull*, 124,786–791.
- Bagnara J.T., Matsumoto J. (2006). Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues p.11-59. In: *The Pigmentary System*. Oxford University Press. 2<sup>a</sup> ed. p1229.
- Bargagli R., Corsolini S., Fossi M. C., Martella L, Sanchez-Hernandez J. C., Focardi S. (1998). Antarctic fish *Trematomus bernacchii* as biomonitor of environmental contaminants at Terra Nova Bay Station (Ross Sea). *Mem Natl Inst Polar Res, Spec Issue*, 52, 220–9.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S. (2015). Fitting linear, mixed-effects models using lme4. *J Stat Software*, 67, 1e48.

Bend J. R. Estimation of induction of enzymes that metabolize xenobiotics in vitro and in vivo. (1994) In: Renzoni A, Mattei N, Lari L, Fossi MC, editors. Contaminants in the environment. Boca Raton, FL: Lewis Publishers/ CRC Press, 93–101.

Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H., White, J. S. S. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol Evol*, 24 (3), 127e135.

Bonacci, S., Corsi, I., Chiea, R., Regoli, F., & Focardi, S. (2003). Induction of EROD activity in European eel (*Anguilla anguilla*) experimentally exposed to benzo [a] pyrene and  $\beta$ -naphthoflavone. *Environ Internl*, 29(4), 467-473.

Brandt, C. A., Becker, J. M., Porta, A. (2002). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and terrestrial biota after a spill of crude oil in Trecate. Italy. *Environ Toxicol Chem*, 21 (8), 1638e1643.

Brinkmann, M., Blenkle, H., Salowsky, H., Bluhm, K., Schiwy, S., Tiehm, A., Hollert, H. (2014). Genotoxicity of heterocyclic PAHs in the micronucleus assay with the fish liver cell line RTL-W1. *PloS One*, 9, e85692.

Caruso, M. S. F., Alaburda, J. (2008). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e benzo(a)pireno: uma revisão. *Ver Inst Adolfo Lutz*, 67 (1), 1e27.

Collier, T.K., Anulacion, B.F., Arkoosh, M.R., Dietrich, J.P., Incardona, J.P., Johnson, L.L., Ylitalo, G.M., Myers, M.S., 2013. Effects on Fish of Polycyclic Aromatic HydrocarbonS (PAHS) and Naphthenic Acid Exposures. *Fish Physiol*, 33, 195-255.

Colombo, S., Berlim, I., Delmas, V., Larue, L. (2011). Classical and non-classical melanocytes in vertebrates. In *Melanins and Melanosomes: Biosynthesis, Biogenesis, Physiological and Pathological Functions*, 1st edn (ed. J. Borovanský and P. A. Riley). p21-61.

Connel D. W. (1990). Bioaccumulation of xenobiotics compounds. Boca Raton, FL: CRC Press.

Crawley, M. J. (2012). *The R Book*. John Wiley & Sons, London.

Curtis, L. R., Garzon, C. B., Arkoosh, M., Collier, T., Myers, M. S., Buzitis, J., & Hahn, M. E. (2011). Reduced cytochrome P4501A activity and recovery from oxidative stress during subchronic benzo[a]pyrene and benzo[e]pyrene treatment of rainbow trout. *Toxicol Appl Pharmacol*, 254(1), 1-7.

De Oliveira, C., Franco-Belussi, L., Fanali, L. Z., Santos, L. R. S. (2017). Chapter 6: Use of Melanin-pigmented Cells as a New Tool to Evaluate Effects of Agrochemicals and Other Emerging Contaminants in Brazilian Anurans, p.125-139. Section II: Terrestrial Vertebrates as Experimental Models. In: Ecotoxicology and Genotoxicology Non-traditional Terrestrial Models. (Ed. Marcelo L. Larramendy). eBook (Print ISBN: 978-1-78262-811-8) Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Denison, M. S.; Nagy, S. R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43, 309–334.

Douben, P. (2003). PAHs: An Ecotoxicological Perspective. John Wiley and Sons: New York.

Ellesat, K. S., Tollefsen, K. E., Åsberg, A., Thomas, K. V., & Hylland, K. (2010). Cytotoxicity of atorvastatin and simvastatin on primary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Toxicol Vitro*, 24 (6), 1610–1618.

Fanali, L. Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Domingos, C. R., & de Oliveira, C. (2018). Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environ Poll*, 237, 93–102.

Fanali, L. Z., Valverde, B. S. L, Franco-Belussi, L., Provete, D. B., de Oliveira, C., (2017). Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo[a]pyrene. *Amphib-Reptil*, 38, 175e185.

Fenoglio, C., Boncompagni, E., Fasola, M., Gandini, C., Comizzoli, S., Milanesi, G., Barni, S., (2005). Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 60, 259e268.

Fishelson, L. (2006). Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. *J Morphol*, 267 (1), 57e69.

Forlin L., Haux C., Karlsson-Norrgrén L., Runn P., Larsson A. (1986). Biotransformation enzyme activities and histopathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) treated with cadmium. *Aquat Toxicol*, 8(1), 51–64.

Fournie, J. W., Summers, J. K., Courtney, L. A., Engle, V. D. (2001). Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *J Aquat Anim Health*, 13 (2), 105e116.

- Franco-Belussi, L., Sköld, H. N., de Oliveira, C. (2016). Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. *J Exp Biol*, jeb-134973.
- Goksøyr, A., & Förlin, L. (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat Toxicol*, 22(4), 287-311.
- Hariri, M., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., Taghavi, L., & Shahabinia, A. R. (2018). In situ assessment of Karaj River genotoxic impact with the alkaline comet assay and micronucleus test, on feral brown trout (*Salmo trutta fario*). *Environ Toxicol Pharmacol*, 58, 59–69.
- Haux C., Forlin L. (1988). Biochemical methods for detecting effects of contaminants on fish. *Ambio*, 17(6), 376–380.
- Head, J. A., Jeffery, R. W., Farmahin, R., & Kennedy, S. W. (2015). Potency of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for induction of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in hepatocyte cultures from chicken, Pekin duck, and greater scaup. *Environ Sci Technol*, 49(6), 3787-3794.
- Hedberg, D., and Wallin, M. (2010). Effects of roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicol in Vitro*, 24, 795–802.
- Joo, D. H., Cha, H. J., Kim, K., Jung, M., Ko, J. M., Na, I. S., Ahn, K. J. (2015). Benzo(a)pyrene represses melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. *Mol Cell Toxicol*, 11 (3), 349e355.
- Kaur, R., Shah, T. K., Kaur, S., & Rani, S. (2018). A review on genotoxicity in aquatic organisms and environment. *J Pharm Innov*, 7(1), 353-359.
- Kenward, M. G., Roger, J. H. (1997). Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics*, 53, 983e997.
- Koyama, Y., and Takeuchi, T. (1980). Differential effect of cytochalasin B on the aggregation of melanosomes in cultured mouse melanoma cells. *Anat Rec*, 196, 449–459.
- Laville, N., Ait-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C., & Porcher, J. M. (2004). Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology*, 196 (1/2), 41–55.
- Lenth, R.V. (2016). Least-squares means: the R package lsmeans. *J. Stat. Software* 69, 1e33.

- Logan, D.T., 2007. Perspective on Ecotoxicology of PAHs to Fish. Human and Ecological Risk Assessment: An Int J. 13, 302-316.
- Loumbourdis, N. S., Vogiatzis, A. K. (2002). Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. Ecotoxicol Environ Saf, 53 (1), 52e58.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Bio Chem, 193, 265-275.
- Lüdecke, D. (2016). sjPlot: Data Visualization for Statistics in Social Science. R Package Version 2.1.2. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=sjPlot>.
- Madureira, D. J., Weiss, F. T., Van Midwoud, P., Helbling, D. E., Sturla, S. J., Schirmer, K. (2014). Systems toxicology approach to understand the kinetics of benzo (a) pyrene uptake, biotransformation, and DNA adduct formation in a liver cell model. Chem Res Toxicol, 27 (3), 443e453.
- Malmström, C. M., Koponen, K., Lindström-Seppä, P., Bylund, G. (2004). Induction and localization of hepatic CYP4501A in flounder and rainbow trout exposed to benzo[a]pyrene. Ecotoxicol Environ Saf, 58, 365-372.
- McGuire, J., Moellmann, G., and McKeon, F. (1972). Cytochalasin B and pigment granule translocation. J Cell Biol, 52, 754–758.
- Moen, E. L., Fricano-Kugler, C. J., Luikart, B. W., O'Malley, A. J. (2016). Analyzing clustered data: why and how to account for multiple observations nested within a study participant? PLoS One, 11(1), e0146721.
- Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., (2005). Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. Environ Toxicol, 20 (1), 74e84.
- Pacheco, M., & Santos, M. A. (1998). Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. Ecotoxicol Environ Saf, 40(1-2), 71–76.
- Padrós, J., Pelletier, É., Ribeiro, C. O. (2003): Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. Toxicol Appl Pharm, 192, 45-55.

Pannetier, P., Morin, B., Clérandeau, C., Lacroix, C., Cabon, J., Cachot, J., & Danion, M. (2019). Comparative biomarker responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to benzo[a]pyrene and challenged with betanodavirus at three different life stages. *Sci Total Environ*, 652, 964–976.

Park, H. Y., Kosmadaki, M., Yaar, M., Gilchrest, B. A., (2009). Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell. Mol Life Sci*, 66 (9), 1493e1506.

Pastore, A. S., Santacroce, M. P., Narracci, M., Cavallo, R. A., Acquaviva, M. I., Casalino, E., ... & Crescenzo, G. (2014): Genotoxic damage of benzo[a]pyrene in cultured sea bream (*Sparus aurata L.*) hepatocytes: Harmful effects of chronic exposure. *Mar Environ Res*, 100, 74-85.

Payne, J. F., Fancey, L. F. (1989). Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on immune responses in fish: Change in melanomacrophage centers in flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) exposed to hydrocarbon-contaminated sediments. *Mar Environ Res*, 28(1), 431-435.

Peixoto, M. S., da Silva Junior, F. C., de Oliveira Galvão, M. F., Roubicek, D. A., de Oliveira Alves, N., & de Medeiros, S. R. B. (2019). Oxidative stress, mutagenic effects, and cell death induced by retene. *Chemosphere*, 231, 518-527.

Pérez-Iglesias, J. M., de Arcaute, C. R., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G. S., Larramendy, M. L. (2014). The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol Environ. Saf*, 104, 120e126.

Pronina, S. V., Batueva, M. D., Pronin, N. M. (2014). Characteristics of melanomacrophage centers in the liver and spleen of the roach *Rutilus rutilus* (Cypriniformes: Cyprinidae) in Lake Kotokel during the Haff disease outbreak. *J Ichthyol*, 54(1),104-110.

R Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL<https://www.Rproject.org/>.

Regnault, C., Willison, J., Veyrenc, S., Airieau, A., Méresse, P., Fortier, M., ... & Reynaud, S. (2016). Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo [a] pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*. *Chemosphere*, 155, 519-527.

Regnault, C., Worms, I. A., Oger-Desfeux, C., MelodeLima, C., Veyrenc, S., Bayle, M. L., Reynaud, S. (2014). Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. *BMC genomics*, 15(1), 666.

Ribeiro, H. J., Procópio, M. S., Gomes, J. M. M., Vieira, F. O., Russo, R. C., Balzuweit, K., et al. (2011). Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. *Cell Tissue Res*, 346 (3), 417e425.

Rodionov V. I., Gyoeva F. K., Gelfand V. I. (1991). Kinesin is responsible for centrifugal movement of melanosome granules in melanophores. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(11), 4956–4960.

Rogers, S. L., Karcher, R. L., Roland, J. T., Minin, A. A., Steffen, W., & Gelfand, V. I. (1999). Regulation of melanosome movement in the cell cycle by reversible association with myosin V. *J Cell Biol*, 146(6), 1265-1276.

Rogers, S. L., Tint, I. S., & Gelfand, V. I. (1998). [30] In Vitro motility assay for melanophore pigment organelles. In *Methods in enzymology*, 298, p. 361-372. Academic Press.

Rozdzial, M. M. and Haimo L.T. (1986) Reactivated melanophore motility: differential regulation and nucleotide requirements of bidirectional pigment granule transport. *J Cell Biol*, 103(6), 2755-2764.

Sammak, P. J., Adams, S. R., Harootunian, A. T., Schliwa, M., & Tsien, R. Y. (1992). Intracellular cyclic AMP not calcium, determines the direction of vesicle movement in melanophores: direct measurement by fluorescence ratio imaging. *J Cell Biol*, 117(1), 57-72.

Santana, M.S., Sandrini-Neto, L., Filipak Neto, F., Oliveira Ribeiro, C.A., Di Domenico, M., Prodocimo, M.M., 2018. Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. *Environ Pollut*, 242, 449-461.

Santos, L. R. S., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Borges, R. E., de Oliveira, C. (2014). Effects of Thermal Stress on Hepatic Melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anat Rec*, 297, 864-875.

Schreer, A., Tinson, C., Sherry, J. P., & Schirmer, K. (2005). Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxyethyl ester as a non invasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Anal Biochem*, 344 (1), 76–85.

Sichel, G., Scalia, M., Mondio, F., Corsaro, C. (1997). The amphibian kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. *Pig Cell Res*, 10, 271-287.

Sköld, H. N., Norström, E., & Wallin, M. (2002). Regulatory control of both microtubule- and actin-dependent fish melanosome movement. *Pig Cell Res*, 15(5), 357-366.

Sköld, H. N., Aspengren, S., Cheney, K. L., & Wallin, M. (2016). Fish chromatophores— from molecular motors to animal behavior. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, 321, p. 171-219). Academic Press.

Sturve, J., Balk, L., Liewenborg, B., Adolfsson-Erici, M., Förlin, L., & Almroth, B. C. (2014). Effects of an oil spill in a harbor assessed using biomarkers of exposure in eelpout. *Environ Sci Poll Res*, 21(24), 13758-13768.

Tuma, M. C., & Gelfand, V. I. (1999). Molecular mechanisms of pigment transport in melanophores. *Pig Cell Res*, 12(5), 283-294.

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*, 13(2), 57-149.

Videira, I. F. D. S., Moura, D. F. L., Magina, S. (2013). Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol*, 88 (1), 76e83.

Wakx, A., Regazzetti, A., Dargère, D., Auzeil, N., Gil, S., Evain-Brion, D., Rat, P. (2016). New in vitro biomarkers to detect toxicity in human placental cells: the example of benzo [a] pyrene. *Toxicol Vitro*, 32, 76e85.

Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., & Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Rev Toxicol*, 30(4), 347-570.

Wolke, R. E. (1992). Piscine macrophage aggregates: a review. *Annual Ver Fish Dis*, 2, 91e108.

Yeo, C. D., Kim, Y. A., Lee, H. Y., Kim, J. W., Kim, S. J., Lee, S. H., & Kim, Y. K. (2017). Roflumilast treatment inhibits lung carcinogenesis in benzo(a)pyrene-induced murine lung cancer model. *Eur J Pharmacol*, 812, 189–195.

Zuasti, A., Jara, J. R., Ferre, C., Solano, F. (1989). Occurrence of melanin granules and melanogenesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pig Cell Res*, 2 (2), 93e99.

Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N., Saveliev, A. A., Smith, G.M. (2009). *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology*. Springer, New York.

### 3. ARTIGO II

Curta exposição de *Physalaemus cuvieri* (Anura) ao contaminante benzo[a]pireno: efeitos morfofuncionais nos melanomacrófagos hepáticos e anormalidades eritrocitárias

**Lara Zácari Fanali<sup>1</sup>, Joachim Sturve<sup>2</sup>, Classius de Oliveira<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Graduate Program in Animal Biology, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil

<sup>2</sup>Department of Biological and Environmental Sciences, University of Gothenburg,

Göteborg 405 30, Box 463, Sweden

<sup>3</sup>Department of Biology, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio

Preto, São Paulo 15054-000, Brazil

Corresponding author:

Lara Zácari Fanali,

Department of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054-000. Tel.: +55 17 3221-2387. Telefax: +5517 3221-2390. Email: [lara\\_zacari@hotmail.com](mailto:lara_zacari@hotmail.com)

**Resumo**

Benzo[a]pireno (BaP) é um contaminante de alto risco pela sua toxicidade. Seu processo de biotransformação ocorre com o aumento da expressão da CYP1A1 e gera metabólitos tóxicos. A  $\alpha$ -naftoflavona (aNF) representa um inibidor da CYP1A1 por ligação competitiva ao receptor AhR, impedindo a metabolização do BaP e produção dos metabólitos. Com função de detoxificação, melanomacrófagos (MMs) produzem melanina, armazenada em melanosomos que podem agregar/dispersar pelo citoesqueleto. Essas células podem sofrer influência de xenobióticos. Dessa forma, nos MMs avaliamos a produção e dispersão de melanina, alterações morfológicas no citoesqueleto e atividade fagocítica. Além disso, avaliamos efeitos genotóxicos nos eritrócitos. Testamos também como os MMs se comportam na presença da aNF. *Physalaemus cuvieri*, receberam injeções subcutâneas de 2mg/kg e/ou 20mg/kg de aNF. Para análises fagocíticas, azul de tripan 0.4% foi injetado intraperitonealmente. Seguiram-se os processos para análise de microscopia e genotoxicidade. O aumento da síntese de melanina nos animais expostos ao BaP está relacionado à ação antioxidante da melanina enquanto a diminuição da síntese na interação BaP e aNF desencadeou alta toxicidade para os MMs e degeneração celular. A diminuição das anormalidades pode ser explicada pela permanência no sangue somente os eritrócitos menos danificados, enquanto as células mais danificadas sofreram morte celular.

**Palavras-chave:** melanina, microtúbulos, fígado, detoxificação.

## **Introdução**

Os animais são expostos diariamente a uma infinidade de produtos químicos - naturais ou antropogênicos – presentes no ar, água ou alimentos. Alguns desses produtos são moléculas de sinalização que carregam informações sobre o ambiente do animal, como a presença de alimentos, predadores ou elemento do sexo oposto, enquanto outros produtos são considerados tóxicos e devem ser evitados ou eliminados (Reynaud et al., 2008).

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) agem como uma fonte difusa de contaminação ambiental (Campos et al., 2019). Devido à sua natureza lipofílica, compostos policíclicos aromáticos se associam preferencialmente às fases orgânicas de partículas e sedimentos em suspensão. Eles também são capazes de atravessar membranas lipofílicas e acumular-se em tecidos biológicos (Leppanen, 1999; Bilodeau et al., 2019).

Consequentemente, organismos aquáticos como larvas de anuros epibentônicos, que se encontram próximos a sedimentos, podem ser suscetíveis à contaminação por HPAs através da absorção dérmica e das superfícies respiratórias, mas também pelo sedimento, enquanto se alimentam de detritos (Bilodeau et al., 2019). Organismos adultos são tão propensos à contaminação quanto as larvas, visto que eles mantêm contato direto com água mesmo após a fase larval.

O HPA benzo[a]pireno (BaP) é um contaminante de alto risco, pois além de mutagênico e cancerígeno, também é citotóxico, teratogênico, imunotóxico, hepatotóxico, neurotóxico, genotóxico e atua como desregulador endócrino (Pastore et al., 2014; US EPA, 2014; Gao et al., 2015; Zena et al., 2015; Renault et al., 2014, 2016; Wakx et al., 2016, Fanali et al., 2018). O BaP é um tóxico indireto, pois precisa ser metabolizado em metabólitos solúveis para causar efeitos tóxicos (Gómez-Mendikute et al., 2002).

O processo de metabolização do contaminante se inicia com a ativação e aumento da expressão da proteína CYP1A1 (Hodek et al., 2013; Madureira et al., 2014). Durante o metabolismo de HPAs, espécies altamente reativas de oxigênio (ERO) podem ser geradas (García-Martinez and Livingstone, 1995). Algumas das principais consequências da produção de ERO em sistemas biológicos são oxidação de proteínas, inativação de enzimas e danos ao DNA (Kehrer, 1993).

Anticarcinogenicidade em roedores tem sido atribuída à modulação das enzimas do citocromo P450 que metabolizam compostos xenobióticos e endógenos, incluindo a ativação de procarcinogênicos para suas formas carcinogênicas (Koley et al., 1997). Para prevenir a ativação de carcinogênicos, os chamados compostos quimiopreventivos são frequentemente usados para inibir reações mediadas pela CYP. (Hodek et al., 2009). Estudos mostraram que, dependendo da sua estrutura, os flavonoides podem ativar ou inibir as atividades mediadas pelo P450 (Hodek et al., 2009; Koley et al., 1997).

Sabe-se que a  $\alpha$ -naftoflavona (aNF) ou 7,8-benzoflavona representa um inibidor bem documentado de reações metabólicas mediadas por CYPs da subfamília 1A (CYP1A1) (Bauer et al., 1995; Hodek et al., 2009, 2014), por ligação competitiva ao receptor de hidrocarboneto aril (AhR) (Koley et al., 1997). Após a administração oral de aNF, concentrações plasmáticas elevadas permitem a modulação das atividades da CYP (Wang and Morris, 2008). Contudo, suas concentrações mais baixas são ineficientes, por exemplo, para a inibição do CYP1A1 (Ferguson, 2001; Hodek et al., 2014).

O fígado, além de ser o órgão central do metabolismo, também atua como órgão de armazenamento. Muitas substâncias potencialmente tóxicas são metabolizadas pelas células do parênquima hepático. A ação metabólica das células do parênquima tem sido considerada um importante sistema de defesa contra os xenobióticos e as transformações envolvidas no processo metabólico são denominadas detoxificação (Al-Attar, 2004).

Macrófagos pigmentados, ou melanomacrófagos (MMs) como são chamados, são uma dessas células presentes no parênquima hepático de anfíbios e que auxiliam no processo de detoxificação (Agius and Roberts, 2003; Ribeiro et al., 2011). A melanina produzida e estocada por essa célula fagocítica tem função antioxidante, absorvendo e neutralizando radicais livres produzidos pelos xenobióticos (Zuasti et al., 1989). Sintetizada a partir do aminoácido tirosina, a melanina é depositada em grânulos denominados melanossomos, os quais podem se agregar ao centro celular ou dispersá-los por todo o citoplasma, devido à maquinaria do citoesqueleto celular que, para o transporte dos melanossomos, compreende os microtúbulos e filamentos de actina (Sköld et al., 2002).

Vários estudos toxicológicos mostram alterações nos MMs de anuros e peixes após exposição por xenobióticos (Çakıcı, 2015; de Oliveira et al., 2017; Fanali et al., 2017, 2018; Freire et al., 2019). Algumas evidências indicam que EROs produzidas durante o metabolismo de HPAs podem danificar proteínas citoesqueléticas (Bellomo et al., 1990; Gómez-Mendikute et al., 2002), o que implicaria em alterações no transporte dos melanossomos que poderiam afetar a função dos MMs. Além dessas alterações, anormalidades nucleares eritrocitárias também podem surgir, indicando o potencial genotóxico dos contaminantes (Franco-Belussi et al., 2018; Gregorio et al., 2019; Pérez-Iglesias et al., 2019).

Nesse contexto, segundo a hipótese de que o BaP afeta os MMs do anuro *Physalaemus cuvieri*, tivemos o objetivo de avaliar a produção e dispersão da melanina presente nos MMs, bem como o citoesqueleto desse tipo celular, sua atividade fagocítica e o potencial genotóxico do BaP nos eritrócitos. Além disso, avaliamos se o inibidor aNF levaria ou não a uma diminuição da toxicidade nos MMs e eritrócitos, baseada nos parâmetros avaliados, possivelmente por inibir a geração dos metabólitos tóxicos do BaP.

## Material e método

Foram analisados espécimes adultos de *Physalaemus cuvieri*, do sexo masculino, coletados em brejos localizados na região de São José do Rio Preto, no período reprodutivo (Outubro-Março). Primeiramente, os animais passaram por um processo de aclimação de sete dias, com fotoperíodo de 12:12 claro/escuro, temperatura de  $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e posteriormente ocorreram os experimentos.

### Experimentos com benzo[a]pireno, $\alpha$ -naftoflavona e azul de tripan

O experimento foi realizado no tempo experimental de 48 horas (48h) a fim de testar efeitos imediatos do composto. No primeiro experimento, os animais ( $n = 6$ ) receberam uma única injeção subcutânea contendo a dose de 2mg/kg de BaP (Sigma-Aldrich B1760) diluído em 0.01 ml de óleo mineral. A concentração foi escolhida com base no artigo de Padrós et al. (2003) com adaptações.

Em outro experimento ( $n = 6$ ), utilizamos o inibidor aNF (Sigma-Aldrich N5757), na dose de 20mg/kg, também diluído em 0.01ml de óleo mineral. A dose foi escolhida com base nos estudos de Hodek et al. (2014), visto que não há estudos com anuros.

Todas as injeções ocorreram no dorso do animal, próximas do membro posterior e o grupo controle recebeu apenas óleo mineral.

Portanto, os grupos experimentais foram: Cont, BaP, aNF, BaP+aNF. Para a injeção do BaP+aNF foi utilizada uma única seringa, na qual foi inserida com os dois compostos, pois dessa forma evitamos uma injeção a mais no animal, o que poderia aumentar o nível de estresse. Além disso, uma única agulha foi utilizada para todos os animais, a fim de evitar bolhas na troca de uma agulha por outra e dessa forma termos a

certeza de que foi injetado o composto e não somente ar. Logo após cada injeção a agulha foi limpa em álcool 70%, a fim de evitar qualquer infecção no animal seguinte.

Um grupo separado, mas que recebeu os mesmos tratamentos BaP (n = 6) e aNF (n = 5), foi injetado intraperitonealmente com 0.01ml do corante vital azul de tripan (4%), para avaliarmos a fagocitose. Os grupos experimentais para esse tratamento foram: tripan, tripan+BaP, tripan+aNF, tripan+BaP+aNF.

O projeto tem aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo 150/2016 e RAN/IBAMA/MMA 18573- 1).

Após o período experimental, primeiramente foi retirado sangue da veia femoral do membro posterior, em seguida os animais foram eutanasiados com solução de benzocaína (5g/l). O fígado foi retirado, pesado em balança analítica com precisão 0,05g e seguiram-se os procedimentos para análises hepáticas e de genotoxicidade.

#### Quantificação da área de melanina

Para as análises histológicas fragmentos do fígado foram fixados em Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) por 3 horas, desidratados em série alcoólica, emblocados em historesina (kit Leica) e seccionados em micrótomo (Leica RM2245) na espessura de 2 $\mu$ m. Os cortes foram corados com Hematoxilina-eosina e observados em microscópio (Leica DM4000 B) com sistema de captura de imagens (Leica DFC 280). A quantificação da pigmentação foi realizada pela diferença de intensidade de coloração dos MMs (Santos et al., 2014) com o programa Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc.(versão 6.0). Para cada animal foram feitas 25 fotos, fotografadas aleatoriamente.

### Quantificação do conteúdo da melanina

Fragmentos de fígado foram congelados em *freezer* a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para a quantificação do conteúdo de melanina no interior do fígado o órgão foi descongelado e homogeneizado em solução de NaOH a 1N com 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) e aquecido a  $80^{\circ}\text{C}$  durante duas horas. A mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 15 min, o sobrenadante coletado (1ml) para análises da quantidade de melanina. Os níveis de melanina das amostras foram medidos em duplicata a 475 nm numa placa de fundo plano de 200  $\mu\text{L}$  de amostra em leitor de ELISA. Como referência, foi feita uma solução-mãe de melanina sintética de 10 mg/ml em 1ml de hidróxido de sódio 1N, com 10% de DMSO, aquecida a  $80^{\circ}\text{C}$  durante duas horas. Os valores de absorvância para melanina sintética foram determinados em duplicata e representados graficamente em função da concentração para a preparação de uma curva padrão. As concentrações utilizadas da melanina sintética foram: 200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$  e 12.5  $\mu\text{g/mL}$ .

A partir da regressão linear determinada, a relação matemática entre a absorvância e a concentração foi estabelecida e usada para quantificar a melanina em tecido do fígado.

### Quantificação da fagocitose

O azul de tripan é um corante vital (Khosravi-Far et al., 2008) que, segundo informações ecológicas não contém componentes considerados como sendo persistentes, bioacumulativos e tóxico (PBT), ou muito persistente e muito bioacumulável em níveis de 0,1% ou mais.

Para a quantificação da fagocitose foi administrado todos os dias 0.01ml de corante vital azul de tripan 0,4% injetado intraperitonealmente. Após eutanásia, fragmentos do fígado foram fixados em formol 10%, desidratados em série alcoólica e emblocadas em historesina (kit Leica). Foram feitas secções de 2 $\mu\text{m}$  obtidas em

micrótomo (Leica RM2245). Os cortes foram contra-corados com vermelho neutro e eosina aquosos e observados em microscópio (Leica DM4000 B) com sistema de captura de imagens (Leica DFC 280). Para cada animal foram feitas 3 lâminas, com 20 cortes em cada lâmina e todos os cortes foram analisados. Na lupa mensuramos a área de cada corte, em cada lâmina. No microscópio, foi contabilizado quantos MMs continham o corante fagocitado, a fim de inferir sobre possíveis efeitos do tóxico na fagocitose. E a partir dessas duas mensurações retiramos o índice da fagocitose dos MMs, que consiste no número de MM que fagocitaram o corante, dividido pela área do corte histológico. O azul de tripan foi utilizado apenas com o intuito de conseguirmos observar a fagocitose dos MMs, porém, como não sabemos qual é o efeito do corante na célula, analisamos também como os MMs se comportam na presença do azul de tripan.

#### Análise do citoesqueleto

Fragmentos de fígado foram congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, 2 ml de EDTA 20 mM foram utilizados para dissociar as células do fígado e separar os melanomacrófagos por 24 a 48 horas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Este passo permite que as células sejam dissociadas por ação mecânica de sucção contínua do conteúdo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 1,500 g por 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para formação de pellets. Aos pellets contendo melanomacrófagos foram adicionados KCl (0.56% p / v) por 20 minutos, misturados por 10s para suspender o pellet, que em seguida foi colocado na lâmina.

Para imunocoloração dos microtúbulos, as células foram fixadas em metanol gelado por 6 min e depois lavadas 3x por 5 min com PBS (solução salina tamponada com fosfato) antes da incubação com o anticorpo primário Rabbit polyclonal to beta tubulin - Loading control (Abcam) por 60 min à temperatura ambiente. As células foram então lavadas 3x por 5 min com PBS e incubadas no escuro com o anticorpo secundário Goat

polyclonal secondary antibody to rabbit IgG - H&L (Alexa Fluor® 488) (Abcam) por 45 min, lavadas 3x por 5 min com PBS e enxaguadas em água miliQ para evitar cristais de sal antes que eles deixassem secar (Hedberg and Wallin, 2010).

Contamos 50 células por animal sob um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E100, usando o programa ACT-1 (versão 2.0) e a quantificação foi feita pela medição da área celular fluorescente, usando o programa Image Pro-Plus (versão 6.0).

#### Análise de anormalidades nucleares

Após anestesia na articulação do membro posterior com xilocaína, o sangue foi retirado com seringa e agulha heparinizadas, gotejado na lâmina e foram feitos esfregaços sanguíneos que, após secos, foram fixados em metanol por 20 min e corados com Giemsa 7.5%, por 15min. As seguintes anormalidades nucleares foram mensuradas: eritrócitos anucleados, binucleados, *bud* e presença de micronúcleo. Para cada animal foram contabilizados 1000 eritrócitos (Pérez-Iglesias et al., 2014).

#### Análise estatística

Para as análises de área de melanomacrófagos, citoesqueleto e produção de melanina (grupos tratados com azul de tripan), foi utilizado um Modelo Linear de Efeito Misto (pacote lme4; Bates et al., 2015) (Zuur et al., 2009) com interação entre tempo e tratamento. Os dados de produção de melanina (grupos tratados com azul de tripan) foram transformados por raiz, enquanto os dados de quantificação da área do melanomacrófago e citoesqueleto foram transformados por log. Para controlar a dependência das fotos de cada animal (Crawley, 2012: 703), incluímos o animal como uma interceptação aleatória (Moen et al., 2016). As premissas do modelo foram testadas utilizando gráficos de diagnóstico com o pacote R sjPlot (Lüdecke, 2016). Para testar a diferença entre os níveis de tratamento e os tempos experimentais foi utilizada a média do mínimo quadrado,

utilizando o pacote R *lsmeans* (Lenth, 2016). Os valores de P foram estimados com base nos testes F condicionais (Kenward and Roger, 1997) com aproximação dos graus de liberdade usando *sjPlot*.

Para as análises de produção de melanina (grupos BaP e aNF) e índice da fagocitose, utilizamos um Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM) (pacote *glmmADMB*; Fournier et al., 2012), ajustado pela máxima verossimilhança (aproximação de Laplace) e com animal como interceptação aleatória. Para a melanina, utilizamos uma distribuição gamma e incluímos como fatores fixos o tempo de exposição e o tratamento, enquanto que, para a fagocitose, os dados foram transformados por log e o único fator fixo foi o tratamento. Para testar as diferenças entre os tratamentos (fagocitose) e entre tratamento e tempo experimental (melanina), utilizamos a média do mínimo quadrado, pacote R *lsmeans* (Lenth, 2016).

Para as anormalidades nucleares, utilizamos um Modelo Linear Generalizado (GLM) com distribuição binomial e função log link, englobando a interação entre tempo de exposição e tratamento. Os pressupostos do modelo foram testados com os plots diagnósticos do pacote *sjplot* (Lüdecke, 2016).

Todas as análises foram conduzidas com o software R, versão 3.6.1.

## **Resultados**

### Efeito do BaP e aNF na produção de melanina

Considerando que o grupo controle esteja representando a síntese máxima de melanina dos MMs, ou seja, 100%, constatamos que no grupo tratado com BaP houve um aumento de  $0.125 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$  para  $0.629 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$  ( $p < 0.05$ ) de melanina no tecido, isto é, um aumento de 503.2%. Porém, o grupo que recebeu a combinação de BaP e aNF

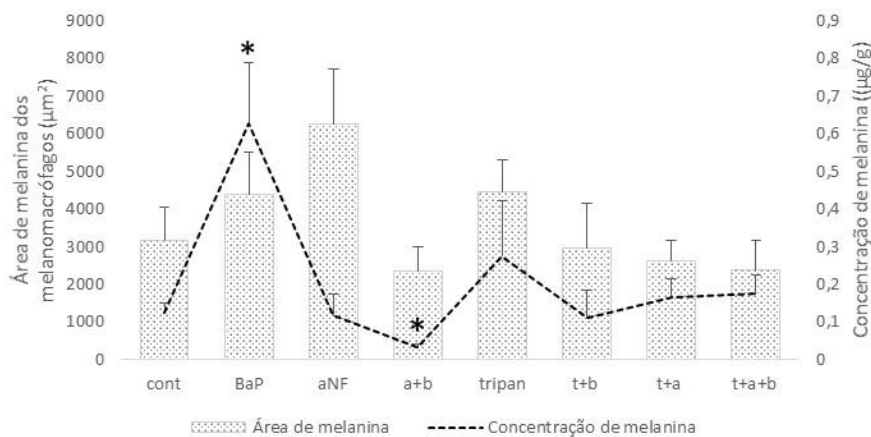
apresentou uma redução na síntese de melanina de  $0.125 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$  para  $0.032 \pm 0.008 \mu\text{g/g}$  ( $p < 0.05$ ), ou seja, 25.6% (Fig 1).

#### Efeito do BaP e aNF na área de melanina dos melanomacrófagos

Podemos observar um sincronismo entre as respostas de síntese de melanina e área de MMs, ou seja, quando há o aumento da síntese de melanina também há o aumento da área de MMs, quando há diminuição da síntese também há diminuição da área. Porém, a área de melanomacrófago não apresentou diferença significativa em nenhum grupo experimental ( $p > 0.05$ ) (Fig 1).

#### Efeito do azul de tripan, BaP e aNF nos melanomacrófagos

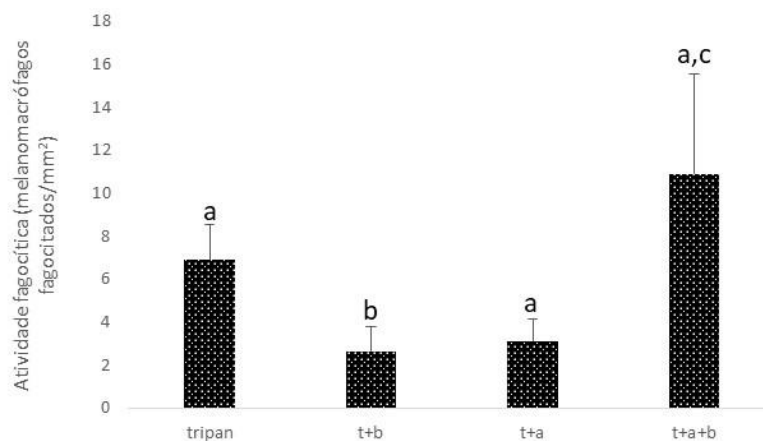
Não houve diferença estatística em nenhum grupo experimental ( $p > 0.05$ ) (Fig 1).



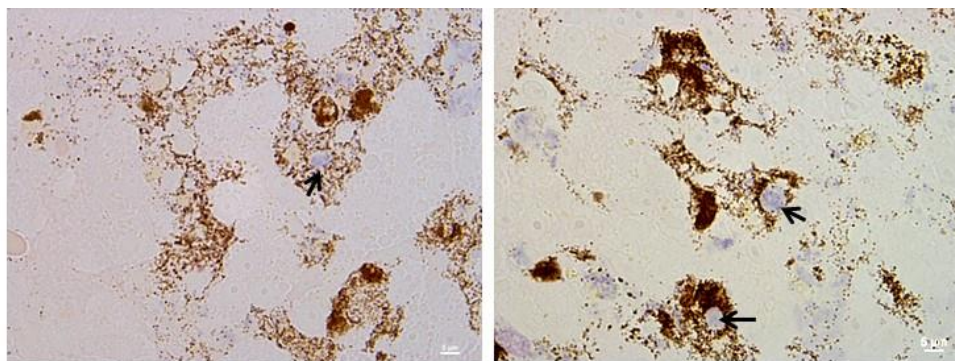
**Figura 1.** Área e concentração de melanina dos melanomacrófagos de *Physalaemus cuvieri* expostos à 2 mg/kg de benzo[a]pireno, 20 mg/kg de  $\alpha$ -naftoflavona e 0.04% de azul de tripan. O asterisco representa diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle ( $P < 0.05$ ). **Cont** = controle; **BaP** = benzo[a]pireno; **aNF** =  $\alpha$ -naftoflavona; **a+b** =  $\alpha$ -naftoflavona+benzo[a]pireno; **tripan** = azul de tripan; **t+b** = azul de tripan+benzo[a]pireno; **t+a** = azul de tripan+ $\alpha$ -naftoflavona; **t+a+b** = azul de tripan+ $\alpha$ -naftoflavona+benzo[a]pireno. Fonte: Elaborado pelo autor.

#### Efeito do BaP e aNF no índice da fagocitose

Partindo de uma condição morfolologicamente apropriada (grupo tratado somente com azul de tripan), que representa 100% da fagocitose, os dados indicam que a dose interna de BaP reduziu a fagocitose de  $6.9 \pm 1.6$  MMs/mm<sup>2</sup> para  $2.6 \pm 1.1$  MMs/mm<sup>2</sup> ( $p < 0.05$ ), o que corresponde a 37.6% do índice. Mas, a administração conjunta de BaP e aNF mostrou um aumento da fagocitose de  $2.6 \pm 1.1$  MMs/mm<sup>2</sup> para  $10.9 \pm 4.6$  MMs/mm<sup>2</sup> ( $p < 0.05$ ), ou seja, 419.23% do índice, quando comparado com o grupo que recebeu somente o BaP, mostrando que, para a função fagocítica dos MMs, o aNF combinado ao BaP promoveu um restabelecimento da fagocitose, enquanto o BaP sozinho promoveu comprometimento funcional. Porém quando a combinação (BaP+aNF) é comparada ao grupo tratado somente com azul de tripan, não há diferença significativa ( $p > 0.05$ ) (Fig 2 e 3).



**Figura 2.** Atividade fagocítica dos melanomacrófagos de *Physalaemus cuvieri* expostos ao azul de tripan, 2 mg/kg de benzo[a]pireno e 20 mg/kg de  $\alpha$ -naftoflavona. O asterisco representa diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0.05$ ). **Tripan** = azul de tripan; **t+b** = azul de tripan+benzo[a]pireno; **t+a** = azul de tripan+ $\alpha$ -naftoflavona; **t+a+b** = azul de tripan+ $\alpha$ -naftoflavona+ benzo[a]pireno. Fonte: Elaborado pelo autor.

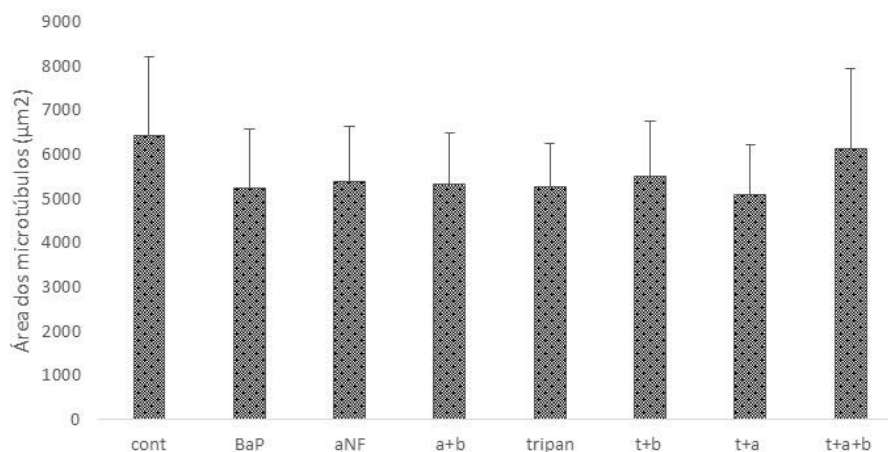


**Figura 3.** Histologia hepática dos melanomacrófagos de *Physalaemus cuvieri* fagocitando o corante azul de tripan (setas).

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### Efeito do azul de tripan, BaP e aNF nos microtúbulos

Não houve diferença significativa da área celular fluorescente, correspondente aos microtúbulos ( $p > 0.05$ ) (Fig 4).



**Figura 4.** Área de microtúbulos demarcada em *Physalaemus cuvieri* expostos à 2 mg/kg de benzo[a]pireno, 20 mg/kg de  $\alpha$ -naftoflavona e 0.04% de azul de tripan. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P > 0.05$ ). **Cont** = controle; **BaP** = benzo[a]pireno; **aNF** =  $\alpha$ -naftoflavona; **a+b** =  $\alpha$ -naftoflavona+benzo[a]pireno; **tripan** = azul de tripan; **t+b** = azul de tripan+benzo[a]pireno; **t+a** = azul de tripan+ $\alpha$ -naftoflavona; **t+a+b** = azul de tripan+ $\alpha$ -naftoflavona+ benzo[a]pireno.

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### Efeito do azul de tripan, BaP e aNF nos eritrócitos

Das anormalidades eritrocitárias mensuradas, no grupo tratado com BaP foi detectada diminuição de 83% de células anucleadas, ausência de binucleadas e 82% do total de anormalidades ( $p < 0.05$ ). O grupo tratado com aNF também apresentou diminuição de 83% de células anucleadas, 66% de binucleadas e 82% do total de anormalidades ( $p < 0.05$ ) (Tabela 1).

A combinação entre BaP e aNF também mostrou menos anormalidades quando comparadas com o grupo controle. Foram 95% menos células anucleadas, ausência de binucleadas e 97% do total de anormalidades ( $p < 0.05$ ) (Tabela 1).

Em relação ao grupo tratado com azul de tripan, também observamos menos anormalidades na combinação de tripan, BaP e aNF, onde constatamos 81% de diminuição de eritrócitos anucleados, ausência de binucleadas e 77% do total de anormalidades ( $p < 0.05$ ) (Tabela 2).

Isso mostra que, a princípio, o BaP não causou genotoxicidade.

**Tabela 1.** Anormalidades nucleares em *Physalaemus cuvieri* expostos à 2 mg/kg de benzo[a]pireno e 20 mg/kg de  $\alpha$ -naftoflavona. **Cont** = controle; **BaP** = benzo[a]pireno; **aNF** =  $\alpha$ -naftoflavona; **a+b** =  $\alpha$ -naftoflavona+benzo[a]pireno.

	Anucleada	Binucleada	Micronúcleo	Bud	Total
cont	4.8±3.3	0.6±0.4	0.4±0.4	0.0±0.0	1.45±1.8
BaP	0.8±0.2*	0.0±0.0*	0.0±0.0	0.2±0.2	0.25±0.2*
aNF	0.8±0.5*	0.2±0.2*	0.0±0.0	0.0±0.0	0.25±0.27*
a+b	0.2±0.2*	0.0±0.0*	0.0±0.0	0.0±0.0	0.04±0.08*

O asterisco (\*) represente diferença significativa entre controle e tratamento (P<0.05).

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 2.** Anormalidades nucleares em *Physalaemus cuvieri* expostos ao azul de tripan. **Tripan** = azul de tripan; **t+b** = azul de tripan+benzo[a]pireno; **t+a** = azul de tripan+ $\alpha$ -naftoflavona; **t+a+b** = azul de tripan+ $\alpha$ -naftoflavona+ benzo[a]pireno.

	Anucleada	Binucleada	Micronúcleo	Bud	Total
tripan	3.7±2.3	0.2±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.9±1.3
t+b	2.0±0.8	0.0±0.0	0.3±0.3	0.0±0.0	0.6±0.5
t+a	2.6±1.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.6±0.7
t+a+b	0.7±0.4*	0.0±0.0*	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.3*

O asterisco (\*) represente diferença significativa entre controle e tratamento (P<0.05).

Fonte: Elaborado pelo autor.

## Discussão

Os animais expostos ao BaP apresentaram aumento da síntese de melanina nos MMs, enquanto a ação combinada dos compostos (BaP+aNF) apresentou diminuição da produção do pigmento.

Estudos mensurando o efeito de contaminantes na produção de melanina dos MMs são escassos. Franco-Belussi et al. (2016) observaram aumento da produção de melanina nos MMs hepáticos de *Eupemphix nattereri* expostos à radiação ultravioleta. Juntamente com o aumento da produção, houve aumento da área de melanina ocupada pelos MMs. A

mensuração da área ou até mesmo do número de MMs são técnicas mais utilizadas em estudos com MMs (Fanali et al., 2017; 2018; Gregorio et al., 2018; Pérez-Iglesias et al., 2019; Vázquez et al., 2020), como os anuros da espécie *Hypsiboas albopunctatus* que foram expostos à 3mg/kg de BaP por 3 dias tiveram aumento da área pigmentada dos MMs (Fanali et al., 2017). *Xenopus laevis* expostos à 1 mg/L de cobre por 3 semanas também tiveram aumento da área dos MMs (Carotenuto et al., 2020).

Uma vez que a melanina tem função antioxidante, o aumento da síntese de melanina dos MMs está relacionado a essa propriedade conferida ao pigmento (Fenoglio et al., 2005; Bach et al., 2018). Além do mais, o aumento da síntese de pigmento melânico é uma resposta em relação à função de detoxificação da célula (Agius and Roberts, 2003).

A combinação de BaP+aNF causou toxicidade aos MMs ao ponto dessas células perderem a capacidade de aumento para agir na detoxificação. Os trabalhos existentes na literatura com o inibidor  $\alpha$ -naftoflavona tratam-se de análises bioquímicas, porém não há trabalhos mostrando efeitos morfológicos do composto. O que podemos observar no nosso estudo é que, embora se tenha conhecimento da ação antagonista da aNF, ele não deixa de ser um composto exógeno ao organismo, podendo então, causar efeitos adversos. Embora o composto sozinho não tenha causado nenhum efeito, a interação dele com o BaP causou diminuição da produção de melanina dos MMs.

De acordo com Larsson (1993), a melanina presente em células pigmentadas tem a capacidade de adsorver substâncias tóxicas para serem liberadas posteriormente em concentrações não tóxicas. No entanto, o acúmulo de altos níveis de substâncias nocivas na célula que contêm melanina podem causar degeneração desse tipo celular (Larsson, 1993) e prejudicar o desempenho normal da sua ação antioxidante (Bach et al., 2018). Ou seja, a exposição às substâncias associadas pode ter provocado toxicidade suficiente para degenerar os MMs, motivo que levou à diminuição da síntese do pigmento.

Além de alteração na síntese de melanina dos MMs, notou-se também diminuição da fagocitose no grupo administrado com BaP seguido de um aumento da fagocitose no grupo tratado com BaP e aNF conjuntamente. Weeks e Warinner (1984), vinculam a diminuição da fagocitose de macrófagos de peixes expostos a altas quantidades de HPAs devido à supressão do sistema imune. A toxicidade do BaP prejudicou a atividade fagocítica dos MMs. Porém, a interação dos compostos (BaP+aNF) foi menos agressiva para a atividade fagocítica do que os compostos isolados. A aNF não só protegeu os MMs contra o BaP como também induziu a uma maior atividade fagocítica, o que pode ser explicado pela ação antagônica que a aNF tem sobre o BaP (Diamond and Gelboin, 1969).

Embora nossos resultados mostrem alterações na síntese de melanina e na fagocitose dos MMs, os microtúbulos não sofreram influência dos compostos. Segundo Hedberg e Wallin (2010), culturas celulares de melanóforos de *Xenopus laevis* permaneceram com os microtúbulos preservados após exposição a 1.75 mM de Roundup tamponado, embora alguns melanossomos pareciam se contrair e a capacidade de se agregar também variava. A agregação e dispersão dos melanossomos através dos microtúbulos e filamentos de actina não dependiam somente da concentração do contaminante, mas também do pH do meio, e dessa forma microtúbulos eram capazes de permanecerem intactos ou não. Exposição a isopropilamina 0.7 mM também mostraram microtúbulos com localização e morfologia intactas (Hedberg and Wallin, 2010). Similarmente como observado em estudos prévios, em nossos estudos os compostos não interferiram na movimentação dos microtúbulos dos MMs de *Physalaemus cuvieri*.

A exposição às substâncias mostrou menos anormalidades nos grupos tratados do que no grupo controle, ou seja, BaP e aNF e azul de tripan não desencadearam genotoxicidade. Não existem estudos mostrando os efeitos da aNF ou do azul de tripan nos eritrócitos, porém, quando se trata do BaP, embora seja esperado aumento das

anormalidades devido à toxicidade do BaP, o oposto ocorreu em nosso estudo. Esses resultados podem estar associados a um prejuízo na hematopoiese (Latif et al., 2010).

Pacheco e Santos (2002) mostraram em seu estudo com *Anguilla anguilla* que os experimento com BaP apresentaram diminuição de anormalidades após o terceiro dia de exposição a 0.45  $\mu\text{M}$ , seguido por um declínio acentuado após 7 dias de exposição. Nem mesmo na maior concentração de 0.9  $\mu\text{M}$ , após 30 dias de exposição, houve aumento de anormalidades. Os autores acreditam que uma alta taxa de destruição dos eritrócitos, causada pelo contaminante, pode resultar em uma diminuição no número de eritrócitos maduros no sangue circulante, ou seja, esse efeito pode estar fortemente correlacionado com o desaparecimento observado das anormalidades (Pacheco and Santos 2002).

### **Conclusão**

O aumento da síntese de melanina, associado à diminuição da atividade fagocítica nos animais expostos ao BaP mostram que os MMs foram capazes de executar sua função de detoxificação em resposta à ação tóxica do contaminante, porém, a função fagocítica da célula foi afetada pelo contaminante. A associação de BaP+aNF foi tão prejudicial aos MMs que essas células foram incapazes de responder e assim houve diminuição da produção de melanina. Entretanto, houve aumento da atividade fagocítica, efeito da ação antagônica da aNF.

A diminuição das anormalidades nos mostra que, a toxicidade do BaP pode estar afetando não só os eritrócitos maduros, mas também a produção de células sanguíneas, diminuindo a quantidade de eritrócitos maduros no sangue circulante e conseqüentemente a presença de anormalidades nucleares.

**Agradecimentos**

Os autores agradecem à Lilian Franco-Belussi pelo auxílio com as análises estatísticas. Esse estudo teve o apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processos #2013/02067-5 e #2018/01078-7). CO também foi continuamente apoiado pelo CNPq (auxílios #305081/2015-2 e #304552/2019-4). Agradecemos também à FAPESP pela bolsa de doutorado de LZF (2017/07971-2).

## Referências

Agius, C., Roberts, R. J. (2003). Review: Melano-Macrophage Centres and their Role in Fish Patology. *J Fish Biol*, 26, 499-509.

Al-Attar, A.M. (2004): The influence of dietary grapeseed oil on DMBA-induced liver enzymes disturbance in the frog, *Rana ridibunda*. *Pak. J. Nutr.* 3: 304-309.

Bach, N. C., Marino, D. J., Natale, G. S., & Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289-297.

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S. (2015). Fitting linear, mixed-effects models using lme4. *J Stat Software*, 67, 1e48.

Bauer, E., Guo, Z., Ueng, Y.F., Bell, L.C., Zeldin, D., Guengerich, F.P. (1995). Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol*, 8, 136–142.

Bellomo, G., Mirabelli, F., Richelmi, P., Malorni, W., Iosi, F., & Orrenius, S. (1990). The cytoskeleton as a target in quinone toxicity. *Free Radic Res Commun*, 8(4-6), 391-399.

Bilodeau, J. C., Villagomez, J. G., Kimpe, L. E., Thomas, P. J., Pauli, B. D., Trudeau, V. L., & Blais, J. M. (2019). Toxicokinetics and bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds in wood frog tadpoles (*Lithobates sylvaticus*) exposed to Athabasca oil sands sediment. *Aquat Toxicol*, 207, 217-225.

Çakıcı, O. (2015). Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). *Exp Toxicol Pathol*, 67 (3), 237e243.

Campos, I., Abrantes, N., Pereira, P., & Keizer, J. J. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Fire Effects on Soil Properties*.

Carotenuto, R., Capriello, T., Cofone, R., Galdiero, G., Fogliano, C., & Ferrandino, I. (2020). Impact of copper in *Xenopus laevis* liver: Histological damages and atp7b downregulation. *Ecotoxicol Environ Saf*, 188, 109940.

Crawley, M. J. (2012). *The R Book*. John Wiley & Sons, London.

De Oliveira, C., Franco-Belussi, L., Fanali, L.Z., Santos, L.R.S. (2017). Chapter 6: Use of Melanin-pigmented Cells as a New Tool to Evaluate Effects of Agrochemicals and Other Emerging Contaminants in Brazilian Anurans, p.125-139. Section II: Terrestrial Vertebrates as Experimental Models. In: *Ecotoxicology and Genotoxicology Non-traditional Terrestrial Models*. (Ed. Marcelo L. Larramendy). eBook (Print ISBN: 978-1-78262-811-8) Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Diamond, L., & Gelboin, H. V. (1969). Alpha-naphthoflavone: an inhibitor of hydrocarbon cytotoxicity and microsomal hydroxylase. *Science*, 166(3908), 1023-1025.

Environment Protection Agency – EPA. (2014). Toxicological Review of Benzo[a]pyrene (CASRN 50-32-8). In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). p216.

Fanali, L. Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Domingos, C. R., & de Oliveira, C. (2018). Effects of benzo [a] pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environ Pollut*, 237, 93-102.

Fanali, L.Z., de Lacerda Valverde, B.S., Franco-Belussi, L., Provete, D.B., de Oliveira, C., 2017. Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo [a] pyrene. *Amphib-Reptil* 38, 175e185.

Fenoglio, C., Boncompagni, E., Fasola, M., Gandini, C., Comizzoli, S., Milanese, G., Barni, S., (2005). Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 60, 259e268.

Ferguson LR (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res*, 475: 89–111.

Fournier, D.A., Skaug, H.J., Ancheta, J., Ianelli, J., Magnusson, A., Maunder, M., Nielsen, A., Sibert, J. (2012). AD Model Builder: using automatic differentiation for statistical inference of highly parameterized complex nonlinear models. *Optim. Meth. Software* 27, 233e249.

Franco-Belussi, L., Fanali, L. Z., & De Oliveira, C. (2018). UV-B affects the immune system and promotes nuclear abnormalities in pigmented and non-pigmented bullfrog tadpoles. *J Photoch Photobio B: Biology*, 180, 109-117.

Franco-Belussi, L., Sköld, H. N., & De Oliveira, C. (2016). Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. *J Exp Biol*, 219(9), 1378-1383.

Freire, M. M., Amorim, L. M. F., Buch, A. C., Gonçalves, A. D., Sella, S. M., Cassella, R. J., ... & da Silva-Filho, E. V. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons in bays of the Rio de Janeiro state coast, SE-Brazil: Effects on catfishes. *Environ Res*, 108959.

Gao, D., Wu, M., Wang, C., Wang, Y., & Zuo, Z. (2015). Chronic exposure to low benzo [a] pyrene level causes neurodegenerative disease-like syndromes in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*, 167, 200-208.

Gómez-Mendikute, A., Etxeberria, A., Olabarrieta, I., & Cajaraville, M. P. (2002). Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo (a) pyrene. *Mar Environ Res*, 54(3-5), 431-436.

- Gregorio, L. S., Franco-Belussi, L., & De Oliveira, C. (2019). Genotoxic effects of 4-nonylphenol and Cyproterone Acetate on *Rana catesbeiana* (anura) tadpoles and juveniles. *Environ Pollut*, 251, 879-884.
- Gregorio, L. S., Freitas, J. S., Franco-Belussi, L., & De Oliveira, C. (2018). LPS-induced alterations in reproductive organs and liver pigmentation in the toad *Rhinella diptycha* (Bufonidae). *Can J Zool*, 96(12), 1336-1345.
- Hedberg, D., Wallin, M. (2010): Effects of roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicol Vitro* 24: 795-802.
- Hodek, P., Fousova, P., Brabencova, E., Moserova, M., Pavek, P., Anzenbacherova, E., ... & Stiborova, M. (2014). Effect of dihydromyricetin on benzo [a] pyrene activation in rats. *Neuro Endocrinol Lett*, 35, 158-168.
- Hodek, P., Koblihova, J., Kizek, R., Frei, E., Arlt, V. M., & Stiborova, M. (2013). The relationship between DNA adduct formation by benzo [a] pyrene and expression of its activation enzyme cytochrome P450 1A1 in rat. *Environ Toxicol Pharmacol*, 36(3), 989-996.
- Hodek, P., Tepla, M., Krizkova, J., Sulc, M., & Stiborova, M. (2009). Modulation of cytochrome P450 enzyme system by selected flavonoids. *Neuro Endocrinol Lett*, 30(1), 67.
- Kehrer, J. P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in toxicology*, 23(1), 21-48. Campos, I., Abrantes, N., Pereira, P., & Keizer, J. J. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Fire Effects on Soil Properties*.
- Kenward, M. G., Roger, J. H. (1997). Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics*, 53, 983e997.
- Khosravi-Far, R., Zakeri, Z., Lockshin, R. A., & Piacentini, M. (Eds.). (2008). *Programmed Cell Death* (Vol. 442). Academic Press.
- Koley, A. P., Buters, J. T., Robinson, R. C., Markowitz, A., & Friedman, F. K. (1997). Differential mechanisms of cytochrome P450 inhibition and activation by  $\alpha$ -naphthoflavone, *J Biol Chem*, 272(6), 3149-3152.
- Larsson, B.S. (1993). Interaction between chemicals and melanin. *Pig Cell Melanoma Res.* 6 (3), 127e133.
- Latif, I.K., Karim, A.J., Zuki, A.B.Z., Zamri-Saad, M., Niu, J.P., Noordin, M.M. (2010). Pulmonary modulation of benzo [a] pyrene-induced hemato-and hepatotoxicity in broilers 1. *Poultry Sci.* 89 (7), 1379e1388.
- Lenth, R.V. (2016). Least-squares means: the R package lsmeans. *J. Stat. Software* 69, 1e33.

Leppänen, M. T. (1999). Bioaccumulation of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in the freshwater oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller)(Diss., Joensuu, Univ., 1999): Joensuun Yliopiston Luonnontieteellisiä Julkaisuja.

Lüdecke, D. (2016). sjPlot: data visualization for statistics in social science. R package version 2.1.2. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=sjPlot>.

Madureira, D.J., Weiss, F.T., Van Midwoud, P., Helbling, D.E., Sturla, S.J., Schirmer, K. (2014). Systems toxicology approach to understand the kinetics of benzo (a) pyrene uptake, biotransformation, and DNA adduct formation in a liver cell model. *Chem Res Toxicol*, 27 (3), 443e453.

Martinez, P. G., & Livingstone, D. R. (1995). Benzo [a] pyrene-dione-stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar Environ Res*, 39(1-4), 185-189.

Moen, E. L., Fricano-Kugler, C. J., Luikart, B. W., O'Malley, A. J. (2016). Analyzing clustered data: why and how to account for multiple observations nested within a study participant? *PLoS One*, 11(1), e0146721.

Pacheco, M., & Santos, M. A. (2002). Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol Environ Saf*, 53(3), 331-347.

Padrós, J., Pelletier, É., Ribeiro, C. O. (2003): Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. *Toxicol Appl Pharm*, 192, 45-55.

Pastore, A.S., Santacroce, M.P., Narracci, M., Cavallo, R.A., Acquaviva, M.I., Casalino, E., Crescenzo, G., (2014). Genotoxic damage of benzo [a] pyrene in cultured sea bream (*Sparus aurata* L.) hepatocytes: harmful effects of chronic exposure. *Mar Environ Res*, 100, 74e85.

Payne, J.F.; Fancey, L.F. (1989). Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on immune responses in fish: Change in melanomacrophage centers in flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) exposed to hydrocarbon-contaminated sediments. *Mar Environ Res*. v28(1). pp 431-435.

Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Natale, G. S., & de Oliveira, C. (2019). Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environ Pollut*, 244, 733-746.

Pérez-Iglesias, J.M., de Arcaute, C.R., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G.S., Larramendy, M.L., (2014). The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol Environ Saf*, 104, 120e126.

Pérez-Iglesias, J.M., Soloneski, S., Nikoloff, N., Natale, G.S., Larramendy, M.L. (2015). Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol Environ Saf*, 119, 15e24.

Regnault, C., Willison, J., Veyrenc, S., Airieau, A., M\_eresse, P., Fortier, M., Brousseau, P., Raveton, M., Reynaud, S. (2016). Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo [a] pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*. *Chemosphere* 155, 519e527.

Regnault, C., Worms, I.A., Oger-Desfeux, C., MelodeLima, C., Veyrenc, S., Bayle, M.L., Reynaud, S. (2014). Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. *BMC Genom.* 15 (1), 666.

Reynaud, S., Raveton, M., & Ravanel, P. (2008). Interactions between immune and biotransformation systems in fish: a review. *Aquat Toxicol*, 87(3), 139-145.

Ribeiro, H. J., Procópio, M. S., Gomes, J. M. M., Vieira, F. O., Russo, R. C., Balzuweit, K., et al. (2011). Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. *Cell Tissue Res*, 346 (3), 417e425.

Sköld, H. N., Aspengren, S., & Wallin, M. (2002). The cytoskeleton in fish melanophore melanosome positioning. *Microsc Res Tech*, 58(6), 464-469.

Vázquez, G. R., Da Cuña, R. H., Dorelle, L. S., & Nostro, F. L. L. (2020). Immunohistological Biomarkers of Toxicity by a Pharmaceutical Antidepressant in the Freshwater Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). *Bull Environ Contam Toxicol*, 1-5.

Wakx, A., Regazzetti, A., Dargère, D., Auzeil, N., Gil, S., Evain-Brion, D., ... & Rat, P. (2016). New in vitro biomarkers to detect toxicity in human placental cells: The example of benzo [A] pyrene. *Toxicol Vitro*, 32,76-85.

Wang X.D, Morris M.E. (2008). Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonoid 7,8-benzoflavone in rats. *J Pharm Sci*, 97: 4546–4556.

Weeks, B.A., Warinner, J.E. (1984). Effects of toxic chemicals on macrophage phagocytosis in two estuarine fishes. *Mar Environ Res*, 14: 327-335.

Zena, R., Speciale, A., Calabrò, C., Calò, M., Palombieri, D., Saija, A., ... & Cascio, P. L. (2015). Exposure of sea bream (*Sparus aurata*) to toxic concentrations of benzo [a] pyrene: possible human health effect. *Ecotoxicol Environ Saf*, 122, 116-125.

Zuasti, A., Jara, J. R., Ferre, C., Solano, F. (1989). Occurrence of melanin granules and melanosynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pig Cell Res*, 2 (2), 93e99.

Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N., Saveliev, A. A., Smith, G.M. (2009). *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology*. Springer, New York.

#### 4. Artigo III

Interação entre o prócarcinógeno benzo[a]pireno e o flavonoide  $\alpha$ -naftoflavona nos melanomacrófagos e eritrócitos de *Physalaemus cuvieri* (Anura)

**Lara Zácari Fanali<sup>1</sup>, Joachim Sturve<sup>2</sup>, Classius de Oliveira<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Graduate Program in Animal Biology, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil

<sup>2</sup>Department of Biological and Environmental Sciences, University of Gothenburg,

Göteborg 405 30, Box 463, Sweden

<sup>3</sup>Department of Biology, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio

Preto, São Paulo 15054-000, Brazil

Corresponding author:

Lara Zácari Fanali,

Department of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054-000. Tel.: +55 17 3221-2387. Telefax: +5517 3221-2390. Email: [lara\\_zacari@hotmail.com](mailto:lara_zacari@hotmail.com)

**Resumo**

A contaminação ambiental é uma das causas do declínio de anfíbios. Muitas substâncias químicas são capazes de interagir nos organismos e provocarem efeitos adversos. Benzo[a]pireno (BaP) é um composto tóxico bastante conhecido e  $\alpha$ -naftoflavona (aNF), um inibidor competitivo do BaP que impede sua metabolização. Bioquimicamente é o que ocorre, porém, não se tem conhecimento dos efeitos desse flavonoide em órgãos e tecidos. Melanomacrófagos (MMs) são células de detoxificação responsivas à ação de xenobióticos. Por esse motivo o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do BaP e aNF (isolados e interagindo) nos MMs do anuro *Physalaemus cuvieri* e se eles causam genotoxicidade. Os animais receberam injeções subcutâneas contendo 2mg/kg de BaP e 20mg/kg de aNF durante 7 dias e posteriormente seguiram-se os procedimentos para análises de área de ocupação e produção de melanina dos MMs, microtúbulos e anormalidades nucleares. Os resultados mostraram que não houve diferença em nenhum tratamento das análises mensuradas, o que pode ser explicado pela tolerância dos organismos. Eles têm um limite máximo de resposta que, após ser atingido, o animal perde a capacidade de resposta, mas isso não significa que as substâncias não sejam prejudiciais.

**Palavras-chave:** efeito interativo, inibição, fígado, anormalidade nuclear.

## **Introdução**

A contaminação ambiental está causando declínio populacional de anfíbios (Blaustein et al., 2011). Sabe-se que um contaminante pode não estar sozinho no ambiente. Sendo assim, ele pode ter afinidade com outras substâncias e interagirem (Azevedo and Chasin, 2004). A interação entre substâncias pode afetar a toxicocinética e toxicodinâmica das misturas químicas e com isso, alterar também o efeito da toxicidade (Desalegn et al., 2019). Em geral, as interações em uma mistura levam a um efeito maior (sinergismo e potenciação) ou efeitos mais baixos (antagonismo e inibição) (Azevedo e Chasin 2004; Benford and Bridges 2019; Desalegn et al., 2019).

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são contaminantes encontrados na água, ar, sistemas terrestres e biológicos e transportados entre esses recursos, como por exemplo, lixiviação de HPAs de um recurso do solo para as águas subterrâneas ou transporte para a atmosfera (Campos et al., 2019). Benzo[a]pireno (BaP) é um HPA derivado da combustão incompleta de matéria orgânica e de petróleo que, dentre várias características, é conhecido por seu efeito hepatotóxico (Regnault et al., 2014; 2016; Fanali et al., 2018).

Para exercer efeitos tóxicos, BaP requer ativação metabólica, que ocorre após se ligar ao receptor de hidrocarboneto aril (AhR) e induzir a expressão do seu gene alvo, o citocromo P450 1A1 (CYP1A1) (Lee et al., 2019; Sun et al., 2019). O sistema citocromo P450 (CYP) está em primeiro lugar em termos de versatilidade catalítica e do amplo número de xenobióticos que ele detoxifica ou ativa (Klaassen and Watkins, 2009).

A exposição de HPAs pode causar a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) que supera os mecanismos de defesa antioxidante (Hodek et al., 2014). Porém, flavonoides como a  $\alpha$ -naftoflavona (aNF) modulam o metabolismo do xenobiótico por inibição competitiva, antagonizando o receptor AhR e impedindo assim

a indução de BaP. A administração simultânea de aNF com BaP pode resultar na inibição da atividade da enzima 7-Etoxioresorufina O-deetilase (EROD), diminuindo a formação de adutos de DNA (Smith et al., 2011; Hodek et al., 2014).

Nos vertebrados, o fígado é a maior fonte de enzimas catalizadoras de reações de biotransformação (Klaassen and Watkins, 2009). A grande suscetibilidade do fígado a danos por agentes químicos é presumivelmente uma consequência de seu papel principal no metabolismo de substâncias estranhas (Al-Attar, 2004). Porém, os animais desenvolveram uma variedade de mecanismos para detectar e responder a esses produtos químicos (Reynaud et al., 2008).

O sistema imunológico inato inclui todos os mecanismos de defesa que estão presentes antes do aparecimento do patógeno, compreendendo as barreiras físicas e químicas, células fagocíticas, como macrófagos e células natural killer (NK) (Reynaud et al., 2008). Melanomacrófago (MM) é um fagócito pigmentado presente no fígado de anfíbios que, além de participar da imunidade inata também tem função bactericida e de detoxificação (Agius and Roberts, 2003; Passantino et al., 2014; Franco-Belussi et al., 2013).

Os MMs apresentam vários grânulos de melanossomos, os quais armazenam o principal pigmento dos MMs, a melanina (Agius, 1980; Agius and Roberts, 2003). Os melanossomos podem permanecer agregados no centro celular ou se dispersarem pelo citoplasma, devido à presença de filamentos de actina e microtúbulos, componentes do citoesqueleto responsáveis pelo transporte dos grânulos (Sköld et al., 2002). Porém, estressores ambientais são capazes de interromper os microtúbulos e comprometer o transporte dos melanossomos (Aspengren et al., 2006, Hedberg and Wallin, 2010). Outras alterações causadas por contaminantes são o aumento da frequência de anormalidades

nucleares eritrocitárias, técnica genotóxica comumente utilizada em estudos ecotoxicológicos (Lajmanovich et al., 2013; 2014; Gregorio et al., 2019).

Portanto, em virtude da toxicidade do BaP e inexistência de informação a respeito dos efeitos da aNF em órgãos e tecidos, nosso objetivo foi avaliar o efeito subcrônico dos compostos BaP e aNF (isolados e interagindo) nos melanomacrófagos hepáticos do anuro *Physalaemus cuvieri* e avaliar a genotoxicidade dos compostos nos eritrócitos.

### **Material e método**

Foram analisados espécimes adultos de *Physalaemus cuvieri*, do sexo masculino, coletados em brejos localizados na região de São José do Rio Preto, no período reprodutivo (Outubro-Março). Os animais passaram por um processo de aclimação de sete dias, com fotoperíodo de 12:12 claro/escuro, temperatura de  $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e posteriormente ocorreram os experimentos.

#### Experimentos com benzo[a]pireno e $\alpha$ -naftoflavona

O experimento foi realizado no tempo experimental de 7 dias (7d) a fim de testar efeitos subcrônicos do composto. No primeiro experimento, os animais ( $n = 6$ ) receberam em dias alternados, ou seja, a cada 48h, injeções subcutâneas contendo 2mg/kg de BaP (Sigma-Aldrich B1760) diluído em 0.01 ml de óleo mineral. A concentração foi escolhida com base no artigo de Padrós et al. (2003) com adaptações.

Em outro experimento ( $n = 6$ ), utilizamos o inibidor aNF (Sigma-Aldrich N5757), na concentração de 20mg/kg, também diluído em 0,01ml de óleo mineral. A concentração

foi escolhida com base nos estudos de Hodek et al. (2014), visto que não há estudos com anuros.

Todas as injeções ocorreram no dorso do animal, próximas do membro posterior e o grupo controle recebeu apenas óleo mineral.

Portanto, os grupos experimentais foram: Cont, BaP, aNF, BaP+aNF. Para a injeção do BaP+aNF foi utilizada uma única seringa, na qual foi inserida com os dois compostos, pois dessa forma evitamos uma injeção a mais no animal, o que poderia aumentar o estresse. Além disso, uma única agulha foi utilizada para todos os animais, a fim de evitar bolhas na troca de uma agulha por outra e dessa forma termos a certeza de que foi injetado o composto e não somente ar. Logo após cada injeção a agulha foi limpa em álcool 70%, a fim de evitar qualquer infecção no animal seguinte.

O projeto tem aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo 150/2016 e RAN/IBAMA/MMA 18573- 1).

Após o período experimental, primeiramente foi retirado sangue da veia femoral do membro posterior, em seguida os animais foram eutanasiados com solução de benzocaína (5g/l), o fígado foi retirado, pesado em balança analítica com precisão 0,05g e seguiram-se os procedimentos para análises hepáticas e de genotoxicidade.

#### Quantificação da área de melanina

Para as análises histológicas, fragmentos do fígado foram fixados em Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) por 3 horas, desidratados em série alcoólica e emblocados em historesina (kit Leica). Secções de 2 $\mu$ m foram obtidas em micrótomo (Leica RM2245). Em seguida, os cortes foram corados com Hematoxilina-eosina e observados em microscópio (Leica DM4000 B) com sistema de captura de imagens (Leica DFC 280). A quantificação da pigmentação foi realizada pela diferença

de intensidade de coloração dos MMs (Santos et al., 2014) com o programa Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc.(versão 6.0). Para cada animal foram feitas 25 fotos, fotografadas aleatoriamente.

#### Quantificação do conteúdo da melanina

Fragmentos de fígado foram congelados em *freezer* a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para a quantificação do conteúdo de melanina no interior do fígado o órgão foi descongelado e homogeneizado em solução de NaOH a 1N com 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) e aquecido a  $80^{\circ}\text{C}$  durante duas horas. A mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 15 min, o sobrenadante coletado (1ml) para análises da quantidade de melanina. Os níveis de melanina das amostras foram medidos em duplicata a 475 nm numa placa de fundo plano de 200  $\mu\text{L}$  de amostra em leitor de ELISA. Como referência, foi feita uma solução-mãe de melanina sintética de 10 mg/ml em 1ml de hidróxido de sódio 1N, com 10% de DMSO, aquecida a  $80^{\circ}\text{C}$  durante duas horas. Os valores de absorvância para melanina sintética foram determinados em duplicata e representados graficamente em função da concentração para a preparação de uma curva padrão. A partir da regressão linear determinada, a relação matemática entre a absorvância e a concentração foi estabelecida e usada para quantificar a melanina em tecido do fígado.

#### Análise dos microtúbulos

Fragmentos de fígado foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, 2 ml de EDTA 20 mM foram utilizados para dissociar as células do fígado e separar os melanomacrófagos por 24 a 48 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Este passo permite que as células sejam dissociadas por ação mecânica de sucção contínua do conteúdo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 1,500 g por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  para formação de pellets. Aos pellets

contendo melanomacrófagos foram adicionados KCl (0.56% p/v) por 20 minutos, misturados por 10s para suspender o pellet, que em seguida foi colocado na lâmina.

Para imunocoloração dos microtúbulos, as células foram fixadas em metanol gelado por 6 min e depois lavadas 3x por 5 min com PBS (solução salina tamponada com fosfato) antes da incubação com o anticorpo primário Rabbit polyclonal to beta tubulin - Loading control (Abcam) por 60 min à temperatura ambiente. As células foram então lavadas 3x por 5 min com PBS e incubadas no escuro com o anticorpo secundário Goat polyclonal secondary antibody to rabbit IgG - H&L (Alexa Fluor® 488) (Abcam) por 45 min, lavadas 3x por 5 min com PBS e enxaguadas em água miliQ para evitar cristais de sal antes que eles deixassem secar (Hedberg and Wallin, 2010).

Contamos 50 células por animal sob um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E100, usando o programa ACT-1 (versão 2.0) e a quantificação foi feita pela medição da área celular fluorescente, usando o programa Image Pro-Plus (versão 6.0).

#### Análise de anormalidades nucleares

Após anestesia local (articulação do membro posterior) com xilocaína, o sangue foi retirado com seringa e agulha heparinizadas, gotejado na lâmina e foram feitos esfregaços sanguíneos que, após secos, foram fixados em metanol por 20 min e corados com Giemsa 7.5%, por 15min. As seguintes anormalidades nucleares foram mensuradas: eritrócitos anucleados, binucleados, *bud* e presença de micronúcleo. Para cada animal foram contabilizados 1000 eritrócitos (Pérez-Iglesias et al., 2014).

#### Análise estatística

Para controlar medidas repetidas das fotos/lâminas ao longo do tempo no mesmo anuro, os animais foram incluídos como interceptação aleatória no modelo, exceto para

as análises de anormalidades nucleares. O tempo experimental e tratamento foram colocados como fatores fixos no modelo.

As análises de área de melanomacrófagos e citoesqueleto, foram coordenadas pelo Modelo Linear de Efeito Misto (pacote lme4; Bates et al., 2015) (Zuur et al., 2009), transformadas por log. As premissas do modelo foram testadas utilizando gráficos de diagnóstico com o pacote R sjPlot (Lüdecke, 2016). Para testar a diferença entre os níveis de tratamento e os tempos experimentais foi utilizada a média do mínimo quadrado, utilizando o pacote R lsmeans (Lenth, 2016). Os valores de P foram estimados com base nos testes F condicionais (Kenward and Roger, 1997) com aproximação dos graus de liberdade usando sjPlot.

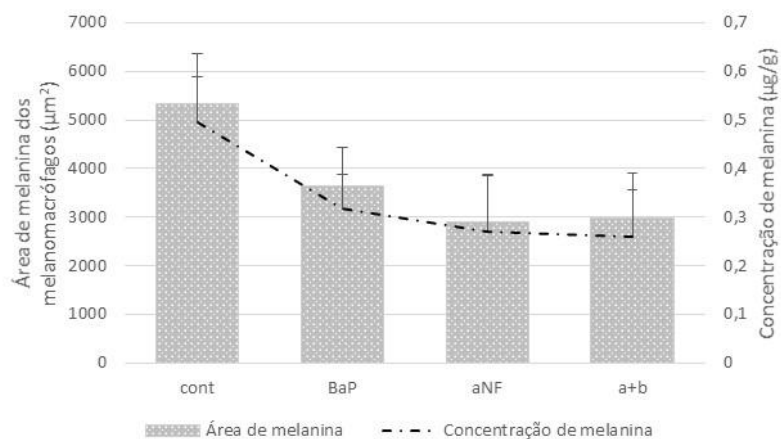
Para as análises de produção de melanina, utilizamos um Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM) (pacote glmmADMB; Fournier et al., 2012), ajustado pela máxima verossimilhança (aproximação de Laplace), com distribuição gamma. Para testar as diferenças entre tratamento e tempo experimental, utilizamos a média do mínimo quadrado, pacote R lsmeans (Lenth, 2016).

Para as anormalidades nucleares, utilizamos um Modelo Linear Generalizado (GLM) com distribuição binomial e função log link, englobando a interação entre tempo de exposição e tratamento. Os pressupostos do modelo foram testados com os plots diagnósticos do pacote *sjplot* (Lüdecke, 2016).

Todas as análises foram conduzidas com o software R, versão 3.6.1.

## **Resultados**

As análises mensuradas nesse estudo (síntese de melanina, área dos MMs, microtúbulos, anormalidades eritrocitárias) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0.05$ ) (Fig. 1 e 2) (Tabela 1).



**Figura 1.** Área e concentração de melanina dos melanomacrófagos de *Physalaemus cuvieri* expostos à 2 mg/kg de benzo[a]pireno e 20 mg/kg de  $\alpha$ -naftoflavona. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). **Cont** = controle; **BaP** = benzo[a]pireno; **aNF** =  $\alpha$ -naftoflavona; **a+b** =  $\alpha$ -naftoflavona+benzo[a]pireno.

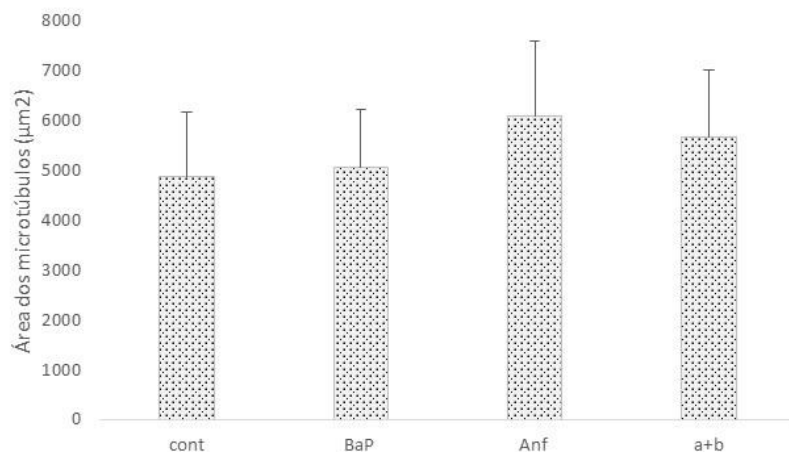
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 1.** Anormalidades nucleares em *Physalaemus cuvieri* expostos à 2 mg/kg de benzo[a]pireno e 20 mg/kg de  $\alpha$ -naftoflavona. **Cont** = controle; **BaP** = benzo[a]pireno; **aNF** =  $\alpha$ -naftoflavona; **a+b** =  $\alpha$ -naftoflavona+benzo[a]pireno.

	Anucleada	Binucleada	Micronúcleo	Bud	Total
cont	0.4±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.2
BaP	1.0±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.25±0.3
aNF	0.8±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.2
a+b	2.2±1.6	0.0±0.0	0.2±0.2	0.0±0.0	0.6±0.8

Não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor.



**Figura 2.** Área de microtúbulos demarcada em *Physalaemus cuvieri* expostos à 2 mg/kg de benzo[a]pireno e 20 mg/kg de  $\alpha$ -naftoflavona. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P > 0.05$ ). **Cont** = controle; **BaP** = benzo[a]pireno; **aNF** =  $\alpha$ -naftoflavona; **a+b** =  $\alpha$ -naftoflavona+benzo[a]pireno. Fonte: Elaborado pelo autor.

## Discussão

As respostas de síntese de melanina dos MMs e a área do pigmento melânico ocupada pelos MMs foram sincrônicas, ou seja, há uma relação entre produção e área de ocupação do pigmento. Embora essas duas análises não tenham tido diferença significativa, podemos observar um valor absoluto inferior nas duas situações quando os espécimes de *Physalaemus cuvieri* foram expostos ao BaP. A nulidade de efeitos nesses parâmetros não contradiz outros trabalhos envolvendo MMs e o contaminante. Os anuros *Hypsiboas albopunctatus*, *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus* quando expostos ao BaP por 3 dias, na concentração de 7 mg/kg para a primeira espécie; e 7 dias na concentração de 2 mg/kg para as outras duas espécies, apresentaram MMs com uma menor área de melanina (Fanali et al., 2017; 2018), mas que foram diferentes estatisticamente do controle.

Klaassen e Watkins (2009) afirmam que, em uma mesma espécie, podem ocorrer diferenças significativas interindividuais na resposta a uma substância química, devido a sutis diferenças genéticas que constituem o polimorfismo genético. Essas diferenças

podem ser responsáveis por reações idiossincráticas aos produtos químicos e por diferenças interindividuais nas respostas tóxicas. Mas um fato importante a ser considerado é essa tendência na diminuição em ambos os estudos, provavelmente causada por interferência do contaminante, uma vez que ele inibe a enzima tirosinase, responsável pela melanogênese (Joo et al., 2015).

Os microtúbulos dos anuros também não foram afetados pelo BaP e aNF. Culturas celulares de melanóforos de *Xenopus laevis* tratadas com glifosato a partir de soluções tamponadas não afetaram os microtúbulos e filamentos de actina, independente da concentração do herbicida (Hedberg and Wallin, 2009). Porém, soluções não tamponadas podem romper as estruturas do citoesqueleto, pois um pH baixo altera o estado de ionização de do composto que a torna mais lipofílica e facilita a entrada na célula, onde ele será capaz de se ligar a cátions e pode interferir em processos celulares como, localização citoesquelética, morfologia e adesão celular. Ou seja, o efeito do glifosato no citoesqueleto é pH-dependente (Hedberg and Wallin, 2009). Pode ser que, para o BaP e aNF afetar os microtúbulos essas duas substâncias dependam de algum fator que desconhecemos.

Outra análise com ausência de efeito foi a genotóxica, tanto na exposição por BaP quanto por aNF. Em *Anguilla anguilla* expostas à  $\beta$ -naftoflavona não houve alterações nas anormalidades nucleares para concentrações que variavam entre 0.1 a 2.7  $\mu\text{M}$  (Teles et al., 2003). Guilherme et al. (2008) também não encontrou indução de anormalidades nucleares na espécie de peixe *Liza aurata* no inverno, apesar da concentração de mercúrio no sangue estar mais alta do que as encontradas no verão, junto com aumento das anormalidades. Os autores dizem que isso pode ser explicado por alterações na dinâmica hematológica, assim como uma diminuição na frequência de eritrócitos imaturos (Guilherme et al., 2008).

Compostos estranhos ao organismo induzem alterações nas atividades das enzimas responsáveis pela metabolização dessas substâncias, o que pode causar profundas mudanças nos efeitos biológicos do composto e também de substratos endógenos das enzimas. Dessa forma, a administração repetida de uma substância pode resultar em alterações na sua farmacocinética, que alterarão sua eficácia ou toxicidade (Benford and Bridges, 2019). Devemos lembrar que nesse estudo o BaP e/ou aNF foram administrados a cada 48h até o sétimo dia de experimento. Altas doses ou longos períodos de exposição nem sempre manifestam efeitos indesejados. Pode ocorrer extrema insensibilidade (Klaassen and Watkins, 2009), pois os organismos apresentam um limite de resposta. A tolerância é um estado de resposta diminuída ao efeito tóxico de um xenobiótico, resultando de exposição prévia a esse xenobiótico ou a uma substância química estruturalmente relacionada. Um dos mecanismos responsáveis para a tolerância ser atingida é a diminuição de resposta ao produto químico (Klaassen and Watkins, 2009), o que explica a ausência de efeitos adversos nos MMs hepáticos e eritrócitos de *P. curvieri*.

### **Conclusão**

Os compostos benzo[a]pireno e  $\alpha$ -naftoflavona não provocaram alterações nos MMs hepáticos e nem genotoxicidade, mas isso não descarta o fato de que os compostos possam ser prejudiciais para outros órgãos e sistemas.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Lilian Franco-Belussi pelo auxílio com as análises estatísticas. Esse estudo teve o apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processos #2013/02067-5 e #2018/01078-7). CO também foi continuamente apoiado pelo CNPq (processos #305081/2015-2 e #304552/2019-4). Agradecemos também à FAPESP pela bolsa de doutorado de LZP (2017/07971-2).

## Referências

Agius, C. (1980). Phylogenetic development of melano-macrophage centers in fish. *J Zool*, 191 (1), 11e31.

Agius, C.; Roberts, R.J. (2003). Review: Melano-Macrophage Centres and their Role in Fish Patology. *J Fish Biol*, 26, 499-509.

Al-Attar, A.M. (2004): The influence of dietary grapeseed oil on DMBA-induced liver enzymes disturbance in the frog, *Rana ridibunda*. *Pak J Nutr*, 3: 304-309.

Aspengren, S., Wielbass, L., and Wallin, M. (2006). Effects of acrylamide, latrunculin, and nocodazole on intracellular transport and cytoskeletal organization in melanophores. *Cell Motil Cytoskel*, 63, 423–436.

Azevedo, F.A.D., & Chasin, A.A.D.M. (2004). *A Ecotoxicologia na análise do risco químico*. Salvador: Centro de Recursos Ambientais–CRA, 432.

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S. (2015). Fitting linear, mixed-effects models using lme4. *J Stat Software*, 67, 1e48.

Benford, D. J., & Bridges, J. W. (2019). Biochemical studies on induction, inhibition, and activation. *Xenobiotic Metabolism and Disposition: The Design of Studies on Novel Compounds*, 194-207.

Blaustein, A.R., Han, B.A., Relyea, R.A., Johnson, P.T.J., Buck, J.C., Gervasi, S.S., Kats, L.B. (2011). The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Ann N.Y. Acad Sci*, 1223 (1), 108e119.

Campos, I., Abrantes, N., Pereira, P., & Keizer, J. J. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Fire Effects on Soil Properties*.

Desalegn, A., Bopp, S., Asturiol, D., Lamon, L., Worth, A., & Paini, A. (2019). Role of Physiologically Based Kinetic modelling in addressing environmental chemical mixtures–A review. *Computational Toxicology*, 10, 158-168.

Fanali, L. Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Domingos, C. R., & de Oliveira, C. (2018). Effects of benzo [a] pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environ Pollut*, 237, 93-102.

Fanali, L.Z., de Lacerda Valverde, B.S., Franco-Belussi, L., Provete, D.B., de Oliveira, C. (2017). Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo [a] pyrene. *Amphib-Reptil* 38, 175e185.

Franco-Belussi, L., Castrucci, A.M.D.L., Oliveira, C. (2013): Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle4, D-Phe7- $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zoology*, 116:316-324.

Gregorio, L. S., Franco-Belussi, L., & De Oliveira, C. (2019). Genotoxic effects of 4-nonylphenol and Cyproterone Acetate on *Rana catesbeiana* (anura) tadpoles and juveniles. *Environ Pollut*, 251, 879-884.

Guilherme, S., Valega, M., Pereira, M. E., Santos, M. A., & Pacheco, M. (2008). Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. *Ecotoxicol Environ Saf*, 70(3), 411-421.

Hedberg, D., and Wallin, M. (2010). Effects of roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicol Vitro*, 24, 795–802.

Hodek, P., Fousova, P., Brabencova, E., Moserova, M., Pavek, P., Anzenbacherova, E., ... & Stiborova, M. (2014). Effect of dihydromyricetin on benzo [a] pyrene activation in rats. *Neuro Endocrinol Lett*, 35, 158-168.

Joo, D.H., Cha, H.J., Kim, K., Jung, M., Ko, J.M., Na, I.S., Ahn, K.J. (2015). Benzo (a) pyrene represses melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. *Mol Cell Toxicol*, 11 (3), 349e355.

Kenward, M. G., Roger, J. H. (1997). Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics*, 53, 983e997.

Klaassen, C. D., & Watkins III, J. B. (2009). *Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull* (Lange). AMGH Editora.

Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Basso, A., & Lorenzatti, E. (2014). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutat Res/Gen Toxicol Environ Mutagenesis*, 769, 7-12.

Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., & Basso, A. (2013). Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl, bispyribac-sodium, and picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. *Water Air Soil Pollut*, 224(3), 1404.

Lee, S. E., Park, S. H., Yoo, J. A., Kwon, K., Kim, J. W., Oh, S. W., ... & Cho, J. Y. (2019). Antagonizing Effects of *Clematis apiifolia* DC. Extract against Benzo [a] pyrene-Induced Damage to Human Keratinocytes. *Oxid Med Cell Long*, 2019.

- Lenth, R.V. (2016). Least-squares means: the R package lsmeans. *J. Stat. Software* 69, 1e33.
- Lüdecke, D. (2016). sjPlot: Data Visualization for Statistics in Social Science. R Package Version 2.1.2. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=sjPlot>.
- Padrós, J., Pelletier, É., Ribeiro, C. O. (2003): Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. *Toxicol Appl Pharm*, 192, 45-55.
- Passantino, L., Santamaria, N., Zupa, R., Pousis, C., Garofalo, R., Cianciotta, A., Jirillo, E., Acone, F., Corriero, A. (2014): Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. *J Fish Dis*, 37: 1-10.
- Pérez-Iglesias, J.M., de Arcaute, C.R., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G.S., Larramendy, M.L. (2014). The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol Environ Saf.*,104, 120e126.
- Regnault, C., Willison, J., Veyrenc, S., Airieau, A., M\_eresse, P., Fortier, M., Brousseau, P., Raveton, M., Reynaud, S. (2016). Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo [a] pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*. *Chemosphere* 155, 519e527.
- Regnault, C., Worms, I.A., Oger-Desfeux, C., MelodeLima, C., Veyrenc, S., Bayle, M.L., Reynaud, S. (2014). Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. *BMC Genom.* 15 (1), 666.
- Reynaud, S., Raveton, M., & Ravanel, P. (2008). Interactions between immune and biotransformation systems in fish: a review. *Aquat Toxicol*, 87(3), 139-145.
- Santos, L. R. S., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Borges, R. E., de Oliveira, C. (2014). Effects of Thermal Stress on Hepatic Melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anat Rec*, 297, 864-875.
- Sköld, H. N., Aspengren, S., & Wallin, M. (2002). The cytoskeleton in fish melanophore melanosome positioning. *Mic Res Tech*, 58(6), 464-469.
- Smith, K. J., Murray, I. A., Tanos, R., Tellew, J., Boitano, A. E., Bisson, W. H., ... & Perdew, G. H. (2011). Identification of a high-affinity ligand that exhibits complete aryl hydrocarbon receptor antagonism. *J Pharmacol Exp Ther*, 338(1), 318-327.

Sun, Y. W., Kosinska, W., & Guttenplan, J. B. (2019). E-cigarette aerosol condensate enhances metabolism of benzo (A) pyrene to genotoxic products, and induces CYP1A1 and CYP1B1, likely by activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Int J Environ Res Public Health*, 16(14), 2468.

Teles, M., Pacheco, M., & Santos, M. A. (2003). *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and  $\beta$ -naphthoflavone. *Ecotoxicol Environ Saf*, 55(1), 98-107.

Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N., Saveliev, A. A., Smith, G.M. (2009). *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology*. Springer, New York.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Em *Oncorhynchus mykiss*, a diminuição da área de melanina dos MMs está associada à agregação de melanossomos, evidenciada pela diminuição da área celular fluorescente, correspondente aos filamentos de actina. Pela primeira vez, estamos usando componentes do citoesqueleto para explicar o porquê da diminuição na área de MMs após a exposição por contaminantes, quando o esperado seria o aumento na área, devido à sua função de detoxificação. Nossa hipótese foi corroborada em partes, pois mostramos que o BaP exerce influência sobre o citoesqueleto e altera o movimento dos melanossomos, mas não pela ruptura dos componentes do citoesqueleto, mas possivelmente por uma inativação da proteína responsável pela dispersão do pigmento. Mais estudos são necessários para elucidar esses mecanismos. Visto que o BaP induziu aumento na frequência de micronúcleos, afirmamos que esse contaminante nessa concentração de 2 mg/kg é genotóxico para a truta arco-íris.

Em *Physalaemus cuvieri*, o aumento da síntese de melanina, associado à diminuição da atividade fagocítica nos animais expostos ao BaP após 48 horas, mostram que os MMs foram capazes de executar sua função de detoxificação em resposta à ação tóxica do contaminante, porém, a função fagocítica da célula foi afetada pelo contaminante. A associação de BaP+aNF foi tão prejudicial aos MMs que essas células foram incapazes de responder e assim houve diminuição da produção de melanina. Entretanto, houve aumento da atividade fagocítica, efeito da ação antagônica da aNF. A diminuição das anormalidades nos mostra que, a toxicidade do BaP pode estar afetando não só os eritrócitos maduros, mas também a produção de células sanguíneas, diminuindo a quantidade de eritrócitos maduros no sangue circulante e conseqüentemente a presença de anormalidades nucleares. Após 7 dias de exposição, os compostos BaP e aNF não provocaram alterações nos MMs hepáticos e nem genotoxicidade, mas isso não descarta o fato de que os compostos possam ser prejudiciais para outros órgãos e sistemas.

## REFERÊNCIAS

- Agius, C., Roberts, R. J. (2003). Review: Melano-Macrophage Centres and their Role in Fish Pathology. *J Fish Biol*, 26, 499-509.
- Bach, N. C., Marino, D. J., Natale, G. S., & Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289-297.
- Bauer, E., Guo, Z., Ueng, Y.F., Bell, L.C., Zeldin, D., Guengerich, F.P., (1995). Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol*, 8, 136–142.
- Blaustein, A.R., Han, B.A., Relyea, R.A., Johnson, P.T.J., Buck, J.C., Gervasi, S.S., Kats, L.B., (2011). The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Ann N.Y. Acad Sci*, 1223 (1), 108e119.
- Brandt, C. A., Becker, J. M., Porta, A. (2002). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and terrestrial biota after a spill of crude oil in Trecate. Italy. *Environ Toxicol Chem*, 21 (8), 1638e1643.
- Chovatiya, R., Medzhitov, R., (2014). Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell*, 54 (2), 281e288.
- Connel D. W. (1990). Bioaccumulation of xenobiotics compounds. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Da Costa Araújo, A. P., de Melo, N. F. S., de Oliveira Junior, A. G., Rodrigues, F. P., Fernandes, T., de Andrade Vieira, J. E., ... & Malafaia, G. (2020). How much are microplastics harmful to the health of amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. *J Hazard Mater*, 382, 121066.
- De Oliveira, C., Franco-Belussi, L., Fanali, L. Z., Santos, L. R. S. (2017). Chapter 6: Use of Melanin-pigmented Cells as a New Tool to Evaluate Effects of Agrochemicals and Other Emerging Contaminants in Brazilian Anurans, p.125-139. Section II: Terrestrial Vertebrates as Experimental Models. In: *Ecotoxicology and Genotoxicology Non-traditional Terrestrial Models*. (Ed. Marcelo L. Larramendy). eBook (Print ISBN: 978-1-78262-811-8) Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Ellesat, K. S., Tollefsen, K. E., Åsberg, A., Thomas, K. V., & Hylland, K. (2010). Cytotoxicity of atorvastatin and simvastatin on primary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Toxicol in Vitro*, 24 (6), 1610–1618.

Environment Protection Agency – EPA. (2014). Toxicological Review of Benzo[a]pyrene (CASRN 50-32-8). In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), 216.

Fanali, L. Z., Valverde, B. S. L, Franco-Belussi, L., Provete, D. B., de Oliveira, C., (2017). Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo[a]pyrene. *Amphib-Reptil*, 38, 175e185.

Fanali, L.Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Rodrigues, C.R., de Oliveira, C. (2018). Effects of benzo[α]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environ Pollut*, 237: 93-102.

Fenoglio, C., Boncompagni, E., Fasola, M., Gandini, C., Comizzoli, S., Milanesi, G., Barni, S., (2005). Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 60, 259e268.

Franco-Belussi, L., Skold, H.N., de Oliveira, C., (2016). Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. *J Exp Biol*, 219 (9), 1378e1383.

Gao, D., Wu, M., Wang, C., Wang, Y., & Zuo, Z. (2015). Chronic exposure to low benzo [a] pyrene level causes neurodegenerative disease-like syndromes in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*, 167, 200-208.

Gregório, L.S., Franco-Belussi, L., Gomes, F.R., Oliveira, C. (2016). Flutamide effects on morphology of reproductive organs and liver of Neotropical Anura, *Rhinella schneideri*. *Aquat Toxicol*, 176: 181–189.

Gregório, L.S., Freitas, J.S., Franco-Belussi, L., de Oliveira, C. (2018). LPS-induced alterations in reproductive organs and liver pigmentation in *Rhinella diptycha* (Bufonidae) toads. *Can J Zool*, 96(12): 1336–1345.

Harris, K.A., Yunker, M.B., Dangerfield, N., Ross, O.S., (2011). Sediment-associated aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal British Columbia, Canada: concentrations, composition, and associated risks to protected sea otters. *Environ Pollut* 159 (10), 2665e2674.

Hodek, P., Fousova, P., Brabencova, E., Moserova, M., Pavek, P., Anzenbacherova, E., ... & Stiborova, M. (2014). Effect of dihydromyricetin on benzo [a] pyrene activation in rats. *Neuro Endocrinol Lett*, 35, 158-168.

Hodek, P., Koblíhová, J., Kizek, R., Frei, E., Arlt, V. M., & Stiborová, M. (2013). The relationship between DNA adduct formation by benzo [a] pyrene and expression of its activation enzyme cytochrome P450 1A1 in rat. *Environ Toxicol Pharmacol*, 36(3), 989-996.

Hodek, P., Tepla, M., Krizkova, J., Sulc, M., & Stiborova, M. (2009). Modulation of cytochrome P450 enzyme system by selected flavonoids. *Neuro Endocrinol Lett*, 30(1), 67.

- Koley, A. P., Buters, J. T., Robinson, R. C., Markowitz, A., & Friedman, F. K. (1997). Differential mechanisms of cytochrome P450 inhibition and activation by  $\alpha$ -naphthoflavone. *J Biol Chem*, 272(6), 3149-3152.
- Laville, N., Ait-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C., & Porcher, J. M. (2004). Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology*, 196 (1/2), 41–55.
- Lemaire, P., Mathieu, A., Carriere, S., Draï, P., Giudicelli, J., & Lafaurie, M. (1990). The uptake metabolism and biological half-life of benzo [a] pyrene in different tissues of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 20(3), 223-233.
- Madureira, D. J., Weiss, F. T., Van Midwoud, P., Helbling, D. E., Sturla, S. J., Schirmer, K. (2014). Systems toxicology approach to understand the kinetics of benzo (a) pyrene uptake, biotransformation, and DNA adduct formation in a liver cell model. *Chem Res Toxicol*, 27 (3), 443e453.
- Morillo, E., Romero, A.S., Madrid, L., Villaverde, J., Maqueda, C., (2008). Characterization and sources of PAHs and potentially toxic metals in urban environments of Sevilla (Southern Spain). *Water Air Soil Pollut*, 187 (1e4), 41e51.
- Pastore, A.S., Santacroce, M.P., Narracci, M., Cavallo, R.A., Acquaviva, M.I., Casalino, E., Crescenzo, G., (2014). Genotoxic damage of benzo [a] pyrene in cultured sea bream (*Sparus aurata* L.) hepatocytes: harmful effects of chronic exposure. *Mar Environ Res*, 100, 74e85.
- Regnault, C., Willison, J., Veyrenc, S., Airieau, A., M\_eresse, P., Fortier, M., Brousseau, P., Raveton, M., Reynaud, S., (2016). Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo [a] pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*. *Chemosphere*, 155, 519e527.
- Regnault, C., Worms, I.A., Oger-Desfeux, C., MelodeLima, C., Veyrenc, S., Bayle, M.L., Reynaud, S., (2014). Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. *BMC Genom*, 15 (1), 666.
- Ribeiro, H. J., Procópio, M. S., Gomes, J. M. M., Vieira, F. O., Russo, R. C., Balzuweit, K., et al. (2011). Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. *Cell Tissue Res*, 346 (3), 417e425.
- Schreer, A., Tinson, C., Sherry, J. P., & Schirmer, K. (2005). Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a non invasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Anal Biochem*, 344 (1), 76–85.
- Srogi, K., (2007). Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environ Chem Lett*, 5 (4), 169e195.

Stark, A., Abrajano, T., Hellou, J., Metcalf-Smith, J.L., (2003). Molecular and isotopic characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon distribution and sources at the international segment of the St. Lawrence River. *Org Geochem*, 34 (2), 225e237.

Steinel, N. C., & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage Centers As a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms. *Front Immunol*, 8, 827.

Wakx, A., Regazzetti, A., Dargère, D., Auzeil, N., Gil, S., Evain-Brion, D., Rat, P. (2016). New in vitro biomarkers to detect toxicity in human placental cells: the example of benzo [a] pyrene. *Toxicol Vitro*, 32, 76e85.

World Health Organization (WHO). (1998). *Guidelines for Drinking-water Quality*, second ed. World Health Organization, Geneva, 123e152.

Zena, R., Speciale, A., Calabrò, C., Calò, M., Palombieri, D., Saija, A., ... & Cascio, P. L. (2015). Exposure of sea bream (*Sparus aurata*) to toxic concentrations of benzo [a] pyrene: possible human health effect. *Ecotoxicol Environ Saf*, 122, 116-125.

Zuasti, A., Jara, J. R., Ferre, C., Solano, F. (1989). Occurrence of melanin granules and melanosynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pig Cell Res*, 2 (2), 93e99.