



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de São José do Rio Preto

André Chamelete

Avaliação da expressão dos genes *cFOS*, *IL-1 β* , *CYP1a1* e
CYP1b1 em *Danio rerio* expostos ao Benzo[a]pireno e tratados
com ligantes do receptor P2X7

São José do Rio Preto
2016

André Chamelete

Avaliação da expressão dos genes *cFOS*, *IL-1 β* , *CYP1a1* e
CYP1b1 em *Danio rerio* expostos ao Benzo[a]pireno e tratados
com ligantes do receptor P2X7

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas de São José do
Rio Preto – IBILCE/UNESP – para
obtenção do título de Mestre em
Biologia Animal.

Área de concentração: Biologia
Estrutural.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Campos

São José do Rio Preto
2016

Chamelete, André.

Avaliação da expressão dos genes cFOS, IL-1 β , CYP1a1 e CYP1b1 em Danio rerio expostos ao Benzo[a]pireno e tratados com ligantes do receptor P2X7 / André Chamelete. -- São José do Rio Preto, 2016

30 f. : il., tabs.

Orientador: Marcelo Campos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia. 2. Toxicologia ambiental. 3. Purinas - Receptores. 4. Expressão gênica. 5. Zebra danio - Efeito da poluição da água. 6. Benzo(a)pireno. I. Campos, Marcelo. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

André Chamelete

Avaliação da expressão dos genes *cFOS*, *IL-1 β* , *CYP1a1* e *CYP1b1* em *Danio rerio* expostos ao Benzo[a]pireno e tratados com ligantes do receptor P2X7

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Marcelo Campos
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dra. Claudiana Lameu Gomes
USP – São Paulo

Prof^a. Dra. Camila Nomura Boscolo
UNESP – Rio Claro

São José do Rio Preto
20 de Janeiro de 2016

RESUMO

O BaP é um contaminante ambiental capaz de causar inflamação e desregulação de vias celulares. Pela ação da CYP1a1 e CYP1b1, é convertido a metabólitos mais reativos. A literatura mostra que o BaP aumenta a expressão de algumas citocinas próinflamatórias, como a IL-1 β , porém, são bem contraditórios os relatos sobre o efeito do BaP no cFOS, o qual apresenta papel importante na proliferação, na formação de tumores e, possivelmente, na inflamação. O objetivo deste estudo foi de elucidar a participação do receptor purinérgico P2X7 sobre a expressão dos genes *IL-1 β* e *cFOS*, durante exposição ao BaP. Foi empregado as técnicas de qPCR para quantificação de expressão gênica, e testes de correlação e regressão entre IL-1 β e cFOS. A exposição ao BaP induziu a expressão dos dois genes, além das enzimas do seu metabolismo. Quando bloqueado o receptor P2X7, além de uma menor indução das CYPs, os níveis de *IL-1 β* e *cFOS* caíram abaixo dos níveis controle, sugerindo a participação do P2X7. Os testes de correlação e regressão mostraram uma relação forte direta entre *IL-1 β* e *cFOS*, reforçando o papel do cFOS na inflamação.

Palavras-chave: P2X7, benzo[a]pireno, cFOS, CYP1a1, CYP1b1, *Danio rerio*.

ABSTRACT

BaP is an environmental contaminant capable to cause inflammation and impair cellular pathways. CYP1a1 and CYP1b1 convert it to more reactive metabolites. Studies show that BaP enhances some proinflammatory cytokines expression, like IL-1 β , yet reports about BaP affecting cFOS, which plays important role in proliferation, tumor formation and inflammation, are controversial. This work aimed to elucidate whether P2X7 purinergic receptor plays a role in *IL-1 β* and *cFOS* expression during BaP exposure. We applied qPCR techniques to quantify gene expression, correlation and regression assays. Our results showed that BaP raised both *IL-1 β* and *cFOS* genes expression, besides CYPs ones. Moreover, when blocking P2X7 receptor, *IL-1 β* and *cFOS* expression dropped under normal levels, which suggest P2X7 participation, in addition to a smaller enzymes induction. Correlation and regression assays exhibited a strong straight relationship between *IL-1 β* and *cFOS* expression, reinforcing the role of cFOS in inflammation.

Palavras-chave: P2X7, benzo[a]pyrene, cFOS, CYP1a1, CYP1b1, *Danio rerio*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	06
1.1. Benzo[a]pireno	06
1.2. Receptores Purinérgicos	07
1.2.1. O Receptor P2X7	08
1.2.2. Ligantes do receptor P2X7	08
1.3. CYP1a1 e CYP1b1	09
1.4. IL-1β e Inflamassomo NLRP3	10
1.5. cFOS	11
1.6. <i>Danio rerio</i>	12
1.7. Objetivo	12
2. DESENVOLVIMENTO	13
2.1. Materiais e Métodos	13
2.1.1. Experimento	13
2.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	13
2.1.3. Análises Estatísticas	14
2.2. Resultados	15
2.2.1. CYP1a1 e CYP1b1	17
2.2.2. IL-1 β	17
2.2.3. cFOS	17
2.2.4. Teste de Correlação de Spearman e Regressão Linear Simples	18
2.3. Discussão	18
3. CONCLUSÃO	20
4. REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO:

As descobertas sobre a atuação de receptores purinérgicos em diversos mecanismos celulares e moleculares vêm se intensificando a cada dia. Hoje sabe-se que tais elementos participam tanto em eventos de curta duração como de longa duração (Ralevic e Burnstock, 1998). Um dos mais notáveis é o receptor purinérgico P2X7, pertencente a uma família de canais iônicos ativados por ATP, com papel em proliferação, inflamação, carcinogênese (Vasileiou et al., 2010; Alves et al., 2013). Um dos processos com participação do receptor P2X7 é a ativação do inflamassomo NLRP3, responsável pela ativação da Caspase-1 e da Interleucina-1 β (Di Virgilio, 2007). Dentre várias citocinas próinflamatórias, a IL-1 β tem um papel especial no recrutamento de neutrófilos e outras células de defesa (Latz, Xiao e Stutz, 2013).

Diversas moléculas xenobióticas são capazes de causar alteração na produção e atividade de moléculas endógenas (IARC, 2010). Um dos xenobióticos mais importantes e mais estudados ultimamente é o Benzo[a]pireno (BaP). Altamente tóxico e carcinogênico, é apontado também como desregulador de diversas vias celulares e, inclusive, dos níveis de citocinas próinflamatórias (IARC, 2012). Além disso, estudos de exposição ao BaP indicam uma modulação na produção de cFOS (Moreau et al., 2015). Também é mostrado na literatura uma via interligando os níveis de cFOS com a IL-1 β (Huang et al., 2014). O cFOS é um proto oncogene, que apresenta, além de outras diversas funções celulares, inclusive de manutenção, um provável papel em inflamação (Yoshida et al., 2012) e carcinogênese (Silvestre et al., 2010).

1.1. Benzo[a]pireno:

O Benzo[a]pireno é um composto da família dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) constituído por cinco anéis benzênicos, gerado pela queima incompleta de matéria orgânica como madeira, óleos, combustíveis, entre outros. Apresenta altas concentrações na fumaça do cigarro, e pode ser encontrado também no solo, ar, água, alimentos e produtos farmacêuticos. Assim, é considerado um contaminante ambiental, por ser altamente tóxico e carcinogênico, promovendo mutagênese, genotoxicidade, desregulação endócrina, imunológica, e de diversas vias de sinalização celular (IARC 2010; 2012). A maioria dos seus efeitos são causados pela ativação do Receptor de Hidrocarboneto Aromático (AhR), que induz a

expressão de enzimas metabolizadoras de xenobióticos do grupo Citocromo P450 (CYPs), das quais as CYP1a1 e CYP1b1 são as principais responsáveis pelo metabolismo do BAP (Nebert et al., 2004; Nebert e Dalton, 2006). Através de sua bioativação por tais enzimas, metabólitos mais reativos são formados, como o Benzo[a]pireno - 7,8 - diol - 9,10 - epóxido (BPDE), o qual é responsável por mutações e danos no DNA (Baird, Hooven e Mahadevan, 2005). Além disso, o BaP também pode causar inflamação em diversos tecidos (Ma et al., 2011; Qamar et al., 2012).

1.2. Receptores Purinérgicos:

O sistema de sinalização purinérgica, que usa purinas e pirimidinas como transmissores químicos, e receptores purinérgicos (ou purinoceptores) como efetores, está profundamente enraizado na evolução e no desenvolvimento, e é um fator fundamental na comunicação celular (Wilson, 1984). O ATP (além de diversas funções celulares, como na parte energética) e seus derivados funcionam como um "sinal de perigo" na maioria das formas mais primitivas de vida (Burnstock and Verkharsty, 2009). Os purinoceptores são receptores de membrana encontrados em todos os tipos de células e tecidos, e envolvidos na regulação de diversos processos biológicos (North, 2002; Burnstock and Verkharsty, 2010). Estão divididos nas famílias P1, cujos membros são ativados por adenosina, e P2 (receptores P2X e P2Y), ativados por ATP e nucleotídeos relacionados. Em mamíferos, foram identificados até o momento quatro subtipos de receptores P1 (A1, A2A, A2B e A3), sete subtipos de receptores P2X (P2X1-7), que são canais iônicos ativados por ligante, e oito subtipos de receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14), que são receptores acoplados à proteína G (Burnstock, 2007; North, 2002). Evolutivamente, os receptores purinérgicos são encontrados em diferentes espécies: peixes como o *Danio rerio*, eucariotos primitivos como o *Dictyostelium*, em roedores e no homem (Burnstock and Verkhatsky, 2009). Além da sinalização purinérgica rápida, envolvida na neurotransmissão, neuromodulação e secreção, existe outro tipo de sinalização purinérgica a longo prazo (trófica) que envolve proliferação, diferenciação, motilidade e morte celular em processos de organogênese e regeneração na maioria dos sistemas do corpo (Burnstock and Verkharsty, 2009).

1.2.1. O Receptor P2X7:

O receptor purinérgico P2X7, que é o alvo deste estudo, é um membro muito distinto da família de receptores P2X e medeia uma infinidade de funções relacionadas à inflamação, imunidade, citotoxicidade, entre outras (Vasileiou et al., 2010; Alves et al., 2013). A potencial utilização do receptor P2X7 como um biomarcador, bem como de alvo terapêutico em diferentes patologias inflamatórias, osteogênicas, e em doenças neurológicas vem crescendo bastante na literatura, colocando-o em papel de destaque (Lenertz et al., 2011). A ativação do receptor P2X7 pelo ATP estimula múltiplos processos de sinalização, incluindo fluxos iônicos (influxo de Ca^{2+} e Na^+ , e efluxo de K^+), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), ERK1/2, p38 e JNKs, o complexo NADPH oxidase, formação de espécies reativas do oxigênio (EROs), fosfolipase D, várias caspases, além da formação de um poro não específico permeável a pequenas moléculas (<900 Da) (Lenertz et al., 2011). O receptor P2X7 aumenta a produção de mediadores ativados por Lipopolissacarídeo (LPS), e pode diretamente aumentar a expressão, processamento e/ou secreção de muitos fatores imunomodulatórios, tais como interleucina-1-Beta (IL-1 β), IL-8, ciclo-oxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Lenertz et al., 2011; Alves et al., 2013). Além disso, o receptor P2X7 tem um importante papel como elemento chave de um complexo multiprotéico envolvido em inflamação e imunidade inata, conhecido como inflamassomo NLRP3 (Di Virgilio, 2007).

1.2.2. Ligantes do receptor P2X7:

Diversos tipos moleculares conhecidos como agonistas ou antagonistas são empregados na ciência para inibir ou ativar receptores. O receptor P2X7 é ativado por altas concentrações de seu agonista endógeno ATP ($\text{EC}_{50} > 100\mu\text{M}$), enquanto seu agonista sintético mais potente utilizado hoje em dia, o 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosina-5'-trifosfato (BzATP; Figura 1.a), apresenta uma $\text{EC}_{50} = 20\mu\text{M}$ (Soltoff, McMillian e Talamo, 1992; Jacobson, Jarvis e Williams, 2002; Donnelly-Roberts et al., 2004). Quanto a seus antagonistas, a literatura apresenta variadas opções, como GSK1482160 (Arulkumaran, Unwin e Tam, 2011), AZD9056 (Keystone et al., 2011), o-ATP (Murgia et al., 1993), Brilliant Blue G (Friedle, Curet e Watters, 2010), A438079 (Donnelly-Roberts e Jarvis, 2007), entre outros. O A438079 (Figura

1.b; 3-(5-(2,3-diclorofenil)-1H-tetrazol-1-il)metil-piridina) tem sido apontado como o antagonista competitivo mais seletivo entre eles, não apresentando ação sobre outros receptores P2, pouca ou nenhuma atividade em uma vasta diversidade de outros receptores de membrana, e com potente bloqueio sobre a ação do BzATP nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} ($\text{IC}_{50} = 100$ e 300 nM, para ratos e humanos, respectivamente) (Nelson et al., 2006).

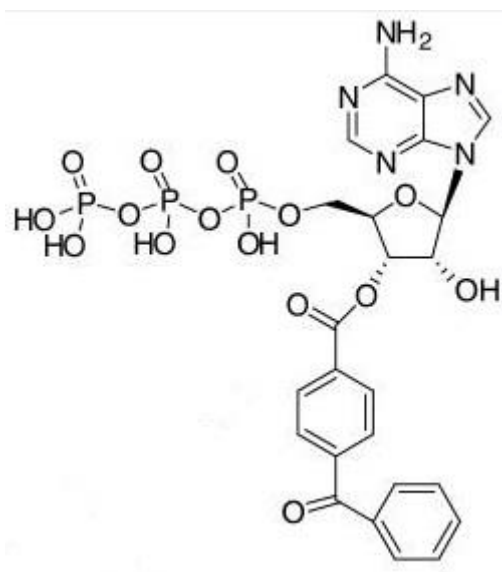


Figura 1.a BzATP.

(Donnelly-Roberts e Jarvis, 2007).

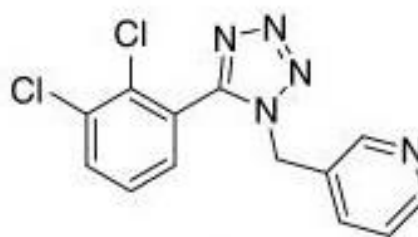


Figura 1.b A438079.

1.3. CYP1a1 e CYP1b1:

O metabolismo de xenobióticos é um processo vital realizado pelos organismos com o objetivo de eliminar compostos tóxicos que poderiam causar danos a níveis celulares, moleculares, ou até teciduais. De modo geral, infecções e inflamações estão correlacionadas à desregulação de enzimas e transportadores ligados ao metabolismo de xenobióticos, os quais tem relação direta com a depuração, biodisponibilidade e toxicidade de tais compostos (Renton, 2004; Aitken, Richardson e Morgan, 2006; Morgan, 2009).

O Citocromo P450 (CYP) é uma extensa superfamília de enzimas de fase 1 do metabolismo de xenobióticos e hormônios (Guengerich, 2008). As principais enzimas CYPs responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos pertencem à família 1, as quais convertem tais compostos em substâncias mais eletrofílicas, facilitando sua reação com a água e consequente eliminação, mas tornando-a, também, mais reativas.

Inclusas nesta família estão as isoformas CYP1a1 e CYP1b1 (Guengerich e Shimada, 1998). Ambas são encontradas, em humanos, principalmente em órgãos extra hepáticos como timo, próstata, útero, intestino e pâncreas, sendo a CYP1b1 superexpressa em tecidos tumorais (Shimada et al., 1996; Sankhwar e Sankhwar, 2014). Em situações normais a CYP1a1 é constitutivamente expressa, enquanto a CYP1b1 é induzível (Aitken, Richardson e Morgan, 2006; Voncrácek, Umannová e Machala, 2011). Entretanto, a conversão à metabólitos mais reativos de HPAs como o BaP, realizada pela CYP1b1, ocorre em taxas maiores do que pela isoforma 1a1 (Kim et al., 1998; Shimada et al., 1999).

Recentemente tem sido mostrado que citocinas próinflamatórias podem desregular o metabolismo de HPAs como o BaP (Voncrácek, Umannová e Machala, 2011). Por exemplo, Umannová e colaboradores (2008; 2011) demonstraram o papel do Fato de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) em alterar o metabolismo do BaP, promovendo aumento dos níveis de seus metabólitos tóxicos, como o BPDE. Em outro trabalho do grupo, Smerdová e colaboradores (2013) observaram aumento de genotoxicidade do BaP, em células alveolares de pulmão de rato, após exposição das células a um meio condicionado obtido de uma linhagem celular de macrófagos contendo uma série de mediadores inflamatórios. Os autores demonstraram que esses efeitos são causados por uma menor produção de enzimas da família CYP1a, o que está de acordo com outros trabalhos (Bleu et al., 2003). Estudos também relatam que o TNF- α causa o aumento da expressão da enzima CYP1b1 induzida por BAP, enquanto que o tratamento com ambos (TNF- α e BaP) induz aumento ainda maior da CYP1b1 (Umannová et al. 2011).

1.4. IL-1 β e Inflamassomo NLRP3:

A IL-1 β é uma das principais citocinas próinflamatórias, pertencente à família 1 das interleucinas (IL-1), atuando no recrutamento de neutrófilos e outras células de defesa (Latz, Xiao e Stutz, 2013). Células dendríticas, monócitos e macrófagos são considerados os principais produtores de IL-1 β , embora também seja produzida por outros tipos celulares (Dinarello, 2009). Por intermédio da ativação do fator de transcrição NF- κ B é induzida a transcrição da pró-IL-1 β . Tal molécula é inativa, devendo ser clivada para se tornar funcional, processo que ocorre através da ação de inflamassomos (Latz et al., 2013).

Os inflamassomos são conjuntos multiproteicos intracelulares que consistem basicamente em uma molécula sensorial reconhecidora de padrão, uma proteína adaptadora ASC e uma caspase (Ting et al., 2008; Latz et al., 2013). Cada um desses complexos ativam a respectiva caspase associada, liberando citocinas na circulação. Para cada tipo de resposta imune, um tipo de inflamassomo pode ser ativado. No caso da IL-1 β , o tipo de inflamassomo que realiza o processo é o NLRP3, do inglês NOD-like receptor protein 3, por utilizar uma molécula de reconhecimento do tipo NOD (Schroder e Tschopp, 2010; Latz et al., 2013). Quando ocorre alguma ameaça à homeostase celular, tal como infecção, dano tecidual ou mesmo um desequilíbrio metabólico, moléculas conhecidas como Padrões Moleculares Associado a Patógenos (PAMPs) ou Padrões Moleculares Associados a Perigo (DAMPs) podem ligar-se à molécula receptora do inflamassomo, ativando-o (Martinon, Burns e Tschopp, 2002; Gross et al., 2011). O inflamassomo NLRP3 também é ativado pelo receptor purinérgico P2X7 (Perregaux e Gabel, 1994; Sutterwala et al., 2006; Mariathasan e Monack, 2007; Qu et al., 2007). Concentrações extracelulares de ATP são mantidas em baixas concentrações fisiológicas pelas ectonucleotidases, mas estas concentrações aumentam em condições de infecção ou inflamação (Lazarowski, Boucher e Harden, 2003; Robson et al., 1997). O ATP, ao se ligar no receptor P2X7, gera um efluxo de potássio na célula, ativa o inflamassomo NLRP3 (Gross et al., 2011) e conseqüentemente a caspase-1, que irá clivar a pro-IL-1 β , gerando a forma madura da IL-1 β (Schroder e Tschopp, 2010).

1.5. cFOS:

O cFOS é uma das quatro principais proteínas da família de proto oncogenes Fos, além de FosB, Fra-1 e Fra-2 (Greenberg and Ziff, 1984; Cohen and Curran, 1988; Zerial et al., 1989; Nishina et al., 1990), os quais podem se heterodimerizar com membros da família Jun formando fatores de transcrição conhecidos como Proteínas Ativadoras 1 (AP-1) (Hughes e Dragunow, 1995), que ligam-se em uma sequência específica TGACTCA na região regulatória de genes alvos, como os responsáveis pelo início da síntese de DNA, induzindo ou suprimindo a transcrição (Rauscher et al., 1988; Angel e Karin, 1991). Sua expressão é muito baixa em células normais, porém pode ser rapidamente induzido como resposta nuclear a diversos estímulos como

fatores de crescimento, estímulos sensoriais e por neurotransmissores (Curran e Morgan, 1987; Kovary e Bravo, 1992; Hughes e Dragunow, 1995; Caputto e Guido, 2000). É ainda capaz de regular o crescimento celular, não apenas como fator de transcrição, mas também agindo independentemente do AP-1 como ativador citoplasmático da biossíntese de lipídeos, tanto em estado normal quanto durante processos celulares patológicos (Caputo, Cardozo-Gizzi e Gil, 2014; Silvestre et al., 2010). Além disso, o cFOS é encontrado em altas taxas citoplasmáticas em células tumorais, sendo que, quando bloqueada sua expressão, a proliferação celular é suprimida (Silvestre et al., 2010). Por fim, o cFOS também age suprimindo a produção de algumas citocinas, como TNF- α , IL-12 e IL-23, ao mesmo tempo que induz a IL-1 β , IL-10 e IL-2, em células dendríticas expostas à lipopolissacarídeos (LPS), demonstrando uma forte participação em inflamação e processos imunológicos (Yoshida et al., 2012).

1.6 *Danio rerio*:

O zebrafish (*Danio rerio*), popularmente conhecido como "paulistinha", é um peixe ornamental de água-doce, cujo seqüenciamento do genoma completo está disponível (Howe et al., 2013) e é considerado um organismo modelo para pesquisa (Berghmans et al., 2005). A facilidade de procriação, aliada a importantes características como pequeno tamanho e relativo baixo custo, fazem desse animal um importante modelo para diferentes estudos mecanísticos e de "screening" de fármacos e compostos tóxicos (Chakraborty et al., 2009; Hill et al., 2005), bem como para estudos de uma ampla diversidade de patologias (Goldsmith e Jobin, 2012). Talvez a mais impressionante característica do *Danio rerio* que o torna tão singular para estudos desse tipo é apresentar grande correlação com vias de sinalização e mecanismos relacionados à fisiologia e fisiopatologia humanas. Neste trabalho foram utilizados exemplares adultos de zebrafish.

1.7. Objetivo:

Assim, o objetivo do presente trabalho é de demonstrar a participação do receptor purinérgico P2X7 quanto à expressão da IL-1 β durante exposição ao BaP. Apesar da literatura descrever de certa forma o papel do P2X7 em relação à IL-1 β , vale salientar que não há estudos sobre a atuação do receptor durante exposição ao BaP, e mesmo

na relação BaP-cFOS os dados são por vezes contraditórios. Aqui sugerimos, inclusive numericamente, que tais de que forma age o receptor, e qual o seu efeito, junto à exposição do BaP, na IL-1 β e no cFOS.

2. DESENVOLVIMENTO:

2.1. Materiais e Métodos:

2.1.1. Experimento:

Peixes da espécie *Danio rerio* foram mantidos no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática (LABCA), do IBILCE/UNESP (São José do Rio Preto, São Paulo), na proporção de 5 animais/3L de água, em temperatura entre 26 e 28°C, com aeração constante, durante um mês antes do experimento, sendo alimentados uma vez por dia. Durante a aclimação, a água foi trocada a cada 3 dias, mas sem trocas durante o experimento. Não houve mortalidade. Os reagentes benzo[a]pireno, A438079 e BzATP foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. No total, foram utilizados 4 grupos experimentais: (1) grupo controle, exposto à acetona (veículo usado para diluir o BaP; 1mL/aquário de 3L, mesma quantidade adicionada com o BaP nos grupos expostos), com injeção intraperitoneal de 20 μ L de salina (veículo usado para o A438079 e BzATP; mesmo volume injetado nos peixes que receberam BzATP ou A438079); (2) grupo BaP, exposto ao contaminante, com injeção intraperitoneal de 20 μ L de salina; (3) grupo BzATP, exposto ao contaminante, com injeção intraperitoneal do agonista do receptor P2X7, o BzATP; (4) grupo A438079, exposto ao contaminante, com injeção intraperitoneal do antagonista do P2X7, o A438079. A concentração de BaP usada foi de 100 μ g/L. As doses de agonista e antagonista do receptor P2X7 usadas foram de 140 μ g/g e 160 μ g/g, respectivamente. As injeções foram feitas 1 hora antes da exposição. O experimento durou 6 dias, quando então os peixes foram sacrificados, coletadas as brânquias e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e posteriormente armazenadas a -80°C até as análises. As injeções intraperitoneais e a anestesia foram feitas de acordo com Kinkel e colaboradores (2010).

2.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR):

O RNA total foi isolado das brânquias com uso de TRIZOL (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Um alíquota de cada

extração foi usada para espectrofotometria (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) para avaliação da concentração e qualidade do RNA. Em seguida, 5 µg to RNA total de cada amostra foi usado para gerar o cDNA através de transcriptase reversa com kit High-Capacity cDNA Archive (Life Technologies), de acordo com o protocolo. As taxas de transcrição do RNA foram medidas por PCR em tempo real (qPCR) através do ABI Step One Plus (Life Technologies). O qPCR foi feito com solução de 25 µL contendo 1 µL de cDNA, SYBR Green Master Mix (Life Technologies), e 0,3 µL de cada primer específico (a tabela 1 apresenta as sequências utilizadas). (Bugiak e Weber, 2009; Leite et al., 2013; Moore e Whitmore, 2014; Cruz et al., 2013). Os ciclos de reação foram formados de uma fase de pré incubação de 2 minutos a 50°C, fase de desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de desnaturação de 15 segundos a 95°C e de anelamento/extensão de 1 minuto cada a 60°C. Foi aplicado o método comparativo $2^{-\Delta\Delta C^T}$ para quantificação relativa da expressão gênica, adotando para a normalização a expressão do gene *EF1-α* como padrão endógeno.

Tabela1. Sequências de Primers para os genes utilizados no qPCR.

CYP1a1 forward	5'-TGCCGATTTCATCCCTTTCC-3'
CYP1a1 reverse	5'-TTCGGTCTTCGCAGTGGTTGA-3'
CYP1b1 forward	5'-AGACCTGACCACCAACGTGC-3'
CYP1b1 reverse	5'-ATGTTCTTACCAAGCTGTCC-3'
IL-1β forward	5'-TCGCCCAGTGCTCCGGCTAC -3'
IL-1β reverse	5'- GCAGCTGGTCGTATCCGTTTGG-3'
cFOS forward	5'-CAGCTCCACCACAGTGAAGA-3'
cFOS reverse	5'-GCTCCAGGTCAGTGTTAGCC-3'
EF1-α forward	5'-CTGGAGGCCAGCTCAAACAT-3'
EF1-α reverse	5'-ATCAAGAAGAGTACCGCTAGCATTAC-3'

2.1.3. Análises Estatísticas:

Os dados do qPCR foram analisados pelo teste de variância Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos, seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, com uso do software Bioestat 5.3 (Instituto Maniraua, Manaus, Brasil).

Os valores de p considerados significantes para diferença estatística foram < 0.05 . Os testes de Correlação de Spearman (para dados não paramétricos) e Regressão Linear Simples (para duas variáveis) entre Interleucina-1 β e cFOS foram feitos através do mesmo software.

2.2. Resultados:

Gráfico 1.a. Expressão gênica relativa da *CYP1a1*.

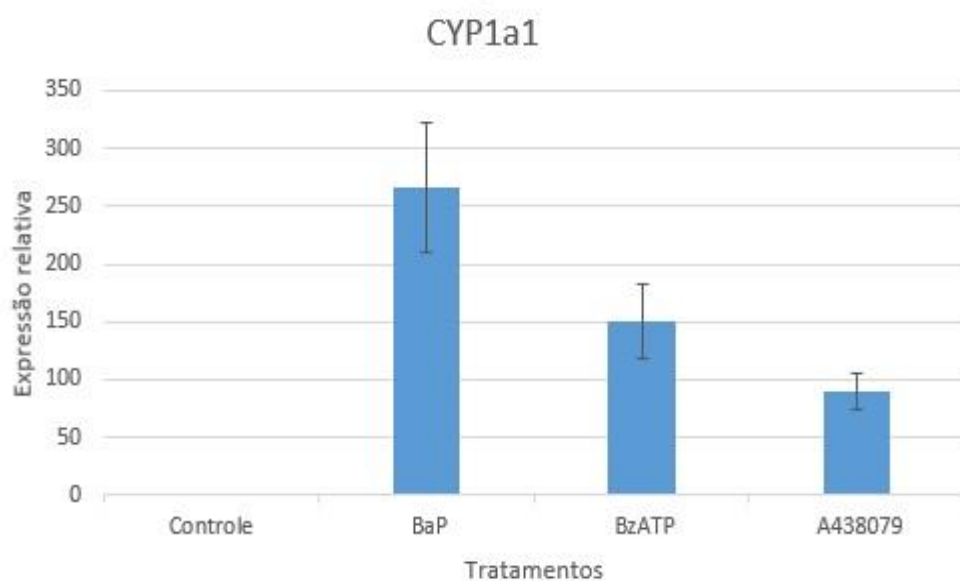


Gráfico 1.b. Expressão gênica relativa da *CYP1b1*.

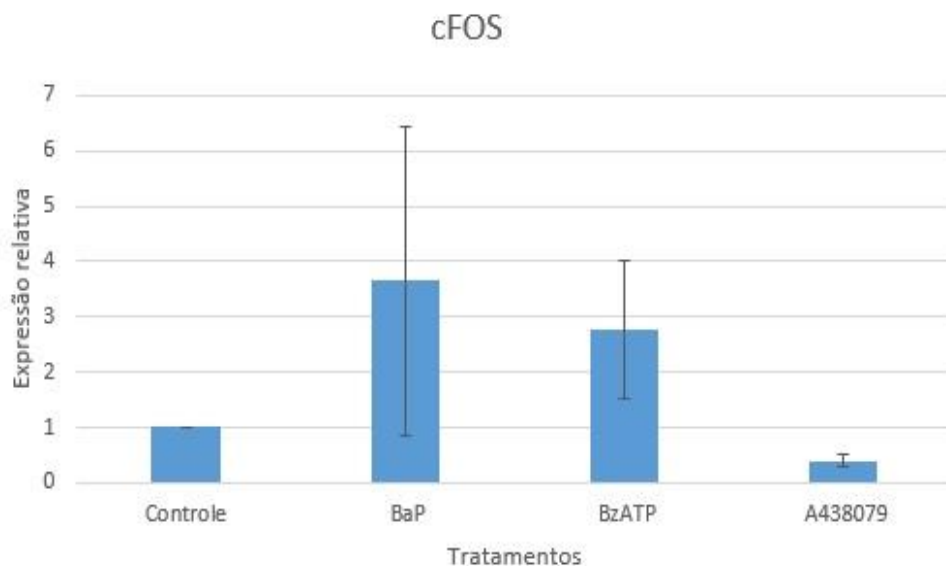
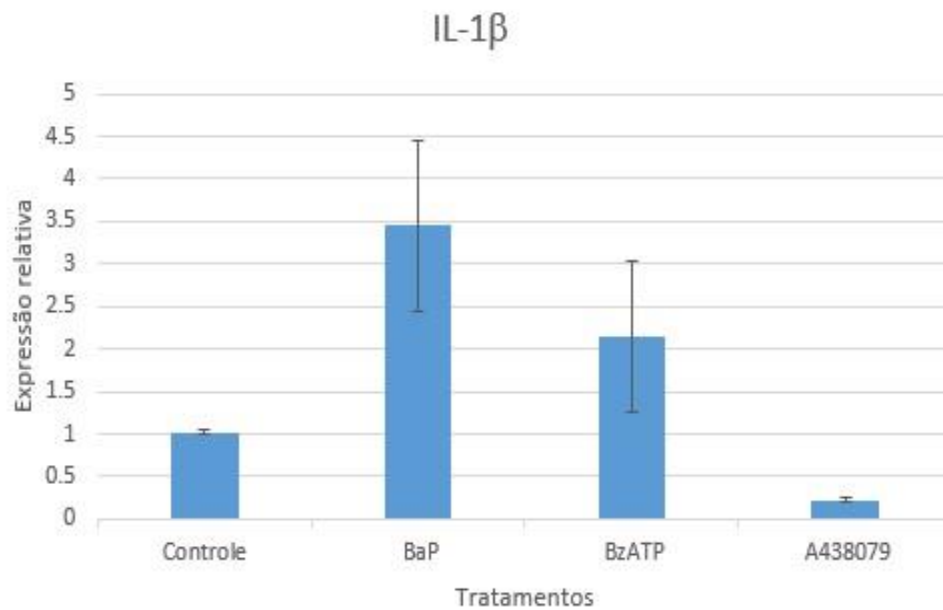
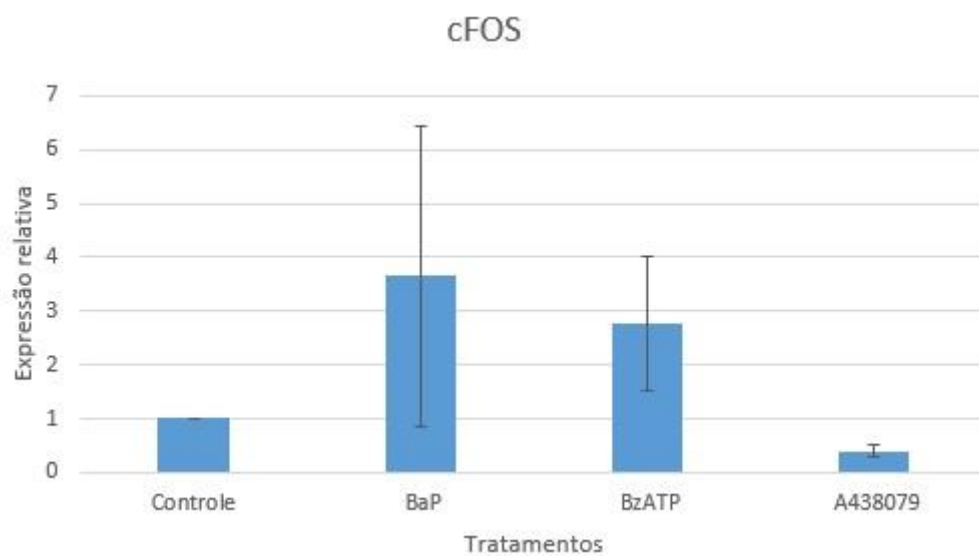


Gráfico 1.c. Expressão gênica relativa da *IL-1 β* .Gráfico 1.a. Expressão gênica relativa da *CYP1a1*.

A tabela 2 mostra os resultados da expressão gênica relativa analisados pelo teste de variância Kruskal-Wallis, empregado em seguida o teste Student-Newman-Keuls como post-hoc.

Tabela 2. Expressão gênica relativa.

GRUPOS	<i>CYP1a1</i>	<i>CYP1b1</i>	<i>IL-1β</i>	<i>cFOS</i>
CONTROLE	1.08367 (± 0.09574)	1.01431 (± 0.01901)	1.01834 (± 0.02019)	1.00186 (± 0.00152)
BaP	266.42070 (± 55.34451) [#]	20.08971 (± 7.54929) [#]	3.45161 (± 1.00484) [#]	3.64389 (± 2.78581) [#]
BzATP	150.07820 (± 32.27547) [#]	8.54647 (± 2.29873) [#]	2.14979 (± 0.88341)	2.77360 (± 1.24551) [#]
A438079	89.12869 (± 15.71319) ^{\$}	2.48956 (± 1.27780) ^{\$}	0.21665 (± 0.02768) ^{\$.£}	0.40385 (± 0.12076) ^{\$.£}

Análise de variância pelo teste Kruskal-wallis. Os dados estão expressos em “média ($\pm$ desvio padrão)”. Os símbolos a seguir indicam diferenças estatísticas ($p < 0.05$): [#] em relação ao grupo controle; ^{\$} em relação ao grupo BaP; [£] em relação ao grupo BzATP.

2.2.1 *CYP1a1* e *CYP1b1*:

As isoformas 1a1 e 1b1 da família de enzimas Citocromo P450 são as principais na primeira fase do metabolismo do Benzo[a]pireno. Assim, como esperado, ambas apresentaram aumento de expressão, tanto no grupo BaP como no grupo BzATP em relação ao grupo controle. Já no grupo A438079, esse aumento foi significativamente menor em relação ao grupo BaP.

2.2.2. *IL-1 β* :

A expressão de *IL-1 β* mostrou-se maior nos grupos tratados com BaP em relação ao grupo controle, exceto no grupo A438079, onde sua expressão foi reduzida em cerca de 5 vezes em comparação ao estado normal, o que está dentro do esperado devido ao bloqueio do receptor P2X7 pelo antagonista.

2.2.3. *cFOS*:

O gene *cFOS* apresentou aumento de expressão semelhante ao *IL-1 β* nos grupos BaP e BzATP em relação ao grupo controle. Porém, assim como a referida citocina, o grupo tratado com A438079 apresentou uma redução de expressão, desta vez em cerca de 2.5 vezes em relação à normalidade.

2.2.4. Teste de Correlação de Spearman e Regressão Linear Simples:

Foi aplicado o teste de Correlação de Spearman nos valores da expressão gênica relativa dos genes *IL-1 β* e *cFOS*, e segundo os dados, há uma relação direta forte ($r_s = 0.8720$; $p < 0.0001$ – o valor de r_s varia de -1.0 a 1.0, indicando relação direta quando positivo, e inversa quando negativo; quando menor que -0.6 ou maior que 0.6, tal relação é considerada forte) entre suas expressões. Em seguida, foi feito do teste de Regressão Linear Simples, segundo o qual rejeitou-se a hipótese de nulidade ($F = 24.4387$; $p < 0.0002$), aceitando a hipótese de relação direta, indicada pelo teste de Correlação de Spearman, entre *IL-1 β* e *cFOS*. Ainda segundo o teste de regressão, 55.23% da variação na expressão do *cFOS* pode ser explicada pela variação na expressão da *IL-1 β* (R^2 ajustado = 0.5523), havendo influência de outros fatores. Devido à complexidade na regulação da expressão desses genes, múltiplos fatores podem estar envolvidos, incluindo as ações de ligantes no receptor P2X7 e os efeitos do BaP.

Tabela 3. Análise de Correlação de Spearman e Regressão Linear Simples para os genes *IL-1 β* e *cFOS*:

CORRELAÇÃO DE SPEARMAN	REGRESSÃO LINEAR SIMPLES
$r_s = 0.8720$	$F = 24.4387$
$p < 0.0001$	$p < 0.0002$
	R^2 (ajustado) = 0.5523

Análise de Correlação de Spearman e Regressão Linear Simples para os genes *IL-1 β* e *cFOS*. r_s : coeficiente de correlação de Spearman; F : regressão; R^2 (ajustado): coeficiente de determinação ajustado.

2.3. Discussão:

O receptor purinérgico P2X7 é uma proteína de membrana relacionado a uma variedade de funções relativas à inflamação, imunidade, citotoxicidade, proliferação, entre outras (Vasileiou et al., 2010; Alves et al., 2013). Ao ser ativado pela ligação do ATP, ele é capaz de estimular o influxo de Ca^{2+} e Na^+ , o efluxo de K^+ , proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) ERK 1/2, p38 e JNKs, o complexo NADPH oxidase, a geração de espécies reativas de oxigênio, fosfolipase D, caspases, e a formação de um poro não específico permeável a moléculas menores que 900 Da (Lenertz et al., 2011). Além disso, Muñoz-Planillo e colaboradores (2013) mostraram que diversos meios de ativação do inflamassomo NLRP3 se dão pelo efluxo de K^+ ,

sendo este movimento então o efetor, fazendo assim uma relação direta entre NLRP3 e P2X7. Já Yaron e colaboradores (2015) demonstraram o papel, não só do efluxo de K^+ , mas também do influxo de Ca^{2+} gerado pelo receptor P2X7 na ativação do NLRP3. Tal inflamassomo é responsável pela ativação da Caspase-1, a qual cliva a forma imatura da Interleucina-1-Beta, liberando-a (Latz et al., 2013).

Foi observado ainda que a ativação do receptor P2X7 em linhagem de macrófagos é uma via responsável pelo aumento de expressão de *cFOS*, através da fosforilação de MAPK e, subsequentemente, CREB, sendo tais eventos gerados, pelo menos em parte, pelo influxo de Ca^{2+} (Gavala, Pfeiffer e Beltics, 2008). Ainda, Huang e colaboradores (2014) demonstraram aumento na expressão da MAPK p38 e, consequentemente, de *cFOS*, em resposta a $IL-1\beta$. Assim, evidencia-se a forte relação entre a atividade do receptor purinérgico P2X7 e a expressão de *IL-1\beta* e *cFOS*. É constante na literatura relatos sobre as ações do BaP em gerar inflamação, em diversos órgãos, tanto em humanos como em modelos animais (Dreij et al., 2010; Dutta et al., 2010; Garçon et al., 2001; Ma et al., 2011; Podechard et al., 2008; Qamar et al., 2012), bem como causar mutagênese, genotoxicidade e desregulação de diversas vias de sinalização celular (IARC 2010; 2012). Diversos estudos mostram a capacidade do BaP de aumentar a expressão de citocinas próinflamatórias como *IL-1\beta*, *IL-8*, *TNF- α* e *NF- κ B*, além de gerar Espécies Reativas de Oxigênio (Hur, Jeon e Hong, 2013; Ji et al., 2013; Martini et al., 2012; Laknaur et al., 2015). Seu metabolismo é feito principalmente pelas enzimas CYP1a1 e CYP1b1, induzidas através do Receptor de Hidrocarbonetos Aromáticos (AhR) e seu translocador nuclear (ARNT) (Nebert et al., 2004; Nebert e Dalton, 2006). Os resultados do presente estudo mostram o aumento das taxas de *CYP1a1*, *CYP1b1* e *IL-1\beta* pela exposição ao BaP. Por outro lado, com o bloqueio do receptor P2X7 pelo A438079, foi obtido uma redução nos níveis do gene *IL-1\beta* em cerca de 5 vezes em relação ao grupo controle (Tabela 2), sugerindo que sua expressão induzida pela exposição ao BaP é diretamente afetada pelo funcionamento do P2X7. Condizente com os dados da literatura sobre a relação da expressão de *cFOS* e *IL-1\beta*, ambos os grupos de exposição ao BaP onde o receptor purinérgico não foi bloqueado (grupos 2 e 3) apresentaram aumento de ambos os genes, em contraste com a redução nas expressões quando utilizado o antagonista do P2X7. Tal relação foi também demonstrada inclusive numericamente neste trabalho, com o teste de Correlação de

Spearman, o qual mostrou uma relação forte e direta entre as expressões de *IL-1 β* e *cFOS* ($r_s = 0.8720$, $p < 0.0001$), pelo valor de r_s ser maior que 0.6 e positivo. A Regressão Linear Simples indicou que 55.23% (R^2 ajustado = 0.5523) da expressão do *cFOS* pode ser explicada pela expressão da *IL-1 β* , devendo-se também à influência de outros fatores.

Um outro ponto notado neste estudo foi a diminuição na indução das enzimas CYP1a1 e 1b1 por meio do bloqueio do receptor P2X7 pelo tratamento com o antagonista A438079. É conhecido que o A438079 é capaz de inibir diretamente a atividade de enzimas do Citocromo P450 (Xie et al., 2013), porém não há estudos relacionando a atividade do P2X7 ou o uso do antagonista com a expressão de enzimas CYPs.

Outro resultado interessante foi o fato do grupo tratado com B-ATP ter apresentado expressões dos genes estudados menores que o grupo BaP, o qual não foi tratado com o agonista. O resultado esperado seria o inverso, considerando que a ativação direta do receptor P2X7 induziria maior expressão da *IL-1 β* , por exemplo. É conhecido que o BzATP é capaz de ativar diferentes subtipos de receptores purinérgicos, além do receptor P2X7 (Khakh et al., 2001; Abbracchio et al., 2006; Burnstock, 2007; Carrasquero et al., 2009; Suplat-Wypych, Dygas e Baranska, 2010), e até mesmo reagir com outras moléculas (Hedden, Benes e Soltoff, 2011). Assim, é possível que outros subtipos de receptores purinérgicos (ou ainda outras classes de receptores ou biomoléculas), quando ativados pelo agonista, podem ter causado efeitos contrários ao do P2X7, resultando em tais dados, apesar de não terem mostrado diferença estatística significativa. No entanto, em nosso modelo não podemos descartar ou afirmar tal possibilidade sem o uso concomitante de antagonistas seletivos para outros receptores supostamente envolvidos para “eliminar” possíveis efeitos de interferência, deixando apenas as ações sobre o receptor P2X7.

3. CONCLUSÃO:

Conclui-se então, a partir dos dados deste estudo, e embasado na literatura, que o aumento na expressão da *IL-1 β* durante a exposição ao BaP possa ser influenciado pelo funcionamento do receptor P2X7, conseqüentemente interferindo na expressão do *cFOS*. Sobre a expressão das enzimas CYPs notada neste trabalho, nossa hipótese, embasada também no trabalho de Xie e colaboradores (2013), é a de que o composto A438079 ligue-se diretamente ao AhR, gerando tal efeito, de forma que

necessita-se de estudos mais aprofundados, com outros antagonistas do receptor, para confirmar tal raciocínio. Caso contrário, ainda, essa expressão pode ser devida à ativação/bloqueio do P2X7. Por fim, sugere-se também estudos sobre os efeitos do agonista BzATP na ativação de outros receptores purinérgicos, e mesmo em relação aos efeitos sobre outras moléculas dos quais se acredita serem gerados pelo funcionamento do receptor P2X7.

4. REFERÊNCIAS:

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boeyr, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M, Gachet, C., Jacobson, K.A., Weisman, G.A. 2006. International union of pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58(3): 281-341.
- Aitken, A.E., Richardson, T.A., Morgan, E.T. 2006. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46: 123-49.
- Alves, L.A., Bezerra, R.J., Faria, R.X., Ferreira, L.G., da Silva-Frutoso, V. 2013. Physiological roles and potential therapeutical applications of the P2X7 receptor in inflammation and pain. *Molecules.* 18(9): 10953-72.
- Angel, P., Karin, M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in the cell proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta.* 1072: 129-57.
- Arulkumaran, N., Unwin, R.J., Tam, F.W. 2011. A potential therapeutic rol for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Investiv Drugs.* 20(7): 897-915.
- Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen.* 45: 106-14.
- Berghmans, S., Jette, C., Langenau, D., Hsu, K., Stewart, R., Look, T., Kanki, J.P. 2005. Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *Biotechniques.* 39(2): 227-37.
- Bleau, A.M., Maurel, P., Pichette, V., Leblond, F., du Souich, P. 2003. Interleukin-1beta, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma released by a viral infection and an aseptic inflammation reduce CYP1A1 and 3A6 expression in rabbit hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 473(2-3): 197-206.

- Bugiak, B., Weber, L.P. 2009. Hepatic and vascular mRNA expression in adult zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to benzo[a]pyrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Aquat Toxicol.* 95(4): 299-306.
- Burnstock, G. 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 87(2): 659-797.
- Burnstock, G., Verkhratsky, A. 2009. Evolutionary origins of the purinergic signaling system. *Acta Physiol (Oxf).* 195(4): 415-47.
- Burnstock, G., Verkhratsky, A. 2010. Long-term (trophic) purinergic signaling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis.* 1: e9.
- Caputto, B.L., Cardozo-Gizzi, A.M., Gil, G.A. 2014. C-Fos: and AP-1 transcription factor with additional cytoplasmic, non-genomic lipid synthesis activation capacity. *Biochim Biophys Acta.* 1841(9): 1241-6.
- Caputto, B.L., Guido, M.E. 2000. Immediate early gene expression within the visual system: light and circadian regulation in the retina and the suprachiasmatic nucleus. *Neurochem Res.* 25(1): 153-62.
- Carrasquero, L.M., Delicado, E.G., Bustillo, D., Gutiérrez-Martín, Y., Artalejo, A.R., Miras-Portugal, M.T. 2009. P2X7 and P2Y13 purinergic receptor mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes. *J Neurochem.* 110(3): 879-89.
- Chakraborty, C., Hsu, C.H., Wen, Z.H., Lin, C.S., Agoramoorthy, G. 2009. Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Curr Drug Metab.* 10(2): 116-24.
- Cohen, D.R., Curran, T. 1988. Fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen. *Mol Cell Biol.* 8(5): 2063-9.
- Curran, T., Morgan, J.I. 1987. Memories of fos. *Bioessays.* 7(6): 255-8.
- Cruz, F.F., Leite, C.E., Pereira, T.C., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Battastini, A.M., Campos, M.M., Morrone, F.B. 2013. Assessment of mercury chloride-induced toxicity and the relevance of P2X7 receptor activation in zebrafish larvae. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 158(3): 159-64.
- Di Virgilio, F. 2007. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci.* 28: 465-472.
- Dinarello, C.A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 27: 519-50.

- Donnelly-Roberts, D.L., Jarvis, M.F. 2007. Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain state. *Br J Pharmacol*. 151(5): 571-9.
- Donnelly-Roberts, D.L., Namovic, M.T., Faltynek, C.R., Jarvis, M.F. 2004. Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 308(3): 1053-61.
- Dreij, K., Rhrissorrakrai, K., Gunsalus, K.C., Geacintov, N.E., Scicchitano, D.A. 2010. Benzo[a]pyrene diol epoxide stimulates an inflammatory response in normal human fibroblasts through a p53 and JNK mediated pathway. *Carcinogenesis*. 3(6): 1149-57.
- Dutta, K., Ghosh, D., Nazmi, A., Kumawat, K.L., Basu, A. 2010. A common carcinogen benzo[a]pyrene causes neuronal death in mouse via microglial activation. *PLoS One*. 5(4): e9984.
- Friedle, S.A., Curet, M.A., Watters, J.J. 2010. Recent patents on novel P2X(7) receptor antagonists and their potential for reducing central nervous system inflammation. *Rec Pat CNS Drug Discov*. 5(1): 35-45.
- Garçon, G., Gosset, P., Garry, S., Marez, T., Hannotiaux, M.H., Shirali, P. 2001. Pulmonary induction of proinflammatory mediators following the rat exposure to benzo[a]pyrene -coated onto Fe₂O₃ particles. *Toxicol Lett*. 121(2): 107-17.
- Gavala, M.L., Pfeiffer, Z.A., Bertics, P.J. 2008. The nucleotide receptor P2RX7 mediates ATP-induced CREB activation in human and murine monocytic cells. *J Leukoc Biol*. 84(4): 1159-71.
- Goldsmith, J.R., Jobin, C. 2012, Think small: zebrafish as a model system of human pathology. *J Biomed Biotechnol*. Doi: 10.1155/2012/817341.
- Greenberg, M.E., Ziff. 1984. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*. 311(5985): 433-8.
- Gross, O., Thomas, C.J., Guarda, G., Tschopp, J. 2011. The inflammasome: an integrated view. *Immunol*. 10: 241-7.
- Guengerich, F.P. 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*. 21(1): 70-83.
- Guengerich, F.P., Shimada, T. 1998. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Cancer Surv*. 400: 201-13.
- Hedden, L., Benes, C.H., Soltoff, S.P. 2011. P2X(7) receptor antagonists display agonist-like effects on cell signaling proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1810(5): 532-42.

Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E. 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 86(1): 6-19.

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliot, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthavadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J., Roest Crolius, H., Rogers, J., Stemple, D.L. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 496(7446): 498-503.

Huang, Q., Lan, F., Xang, X., Yu, Y., Ouyang, X., Zheng, F., Han, J., Lin, Y., Xie, F., Liu, W., Yang, X., Wanf, H., Dong, L., Wang, L., Tan, J., 2014. IL-1 β -induced activation

of p38 promotes metastasis in gastric adenocarcinoma via upregulation of AP-1/c-fos, MMP2 and MMP9. *Mol Cancer*. Doi: 10.1186/1476-4598-13-18.

Hughes, P., Dragunow, M. 1995. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev*. 47(1): 133-78.

Hur, D., Jeon, J.K., Hong, S. 2013. Analysis of immune gene expression modulated by benzo[a]pyrene in head kidney of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 165(1): 49-57.

IARC. 2010. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 92: 1-853.

IARC. 2012. Benzo[a]pyrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 100F: 111-44.

Jacobson, K.A., Jarvis, M.F., Williams, M. 2002. Perspective: purine and pyrimidine. (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem*. 45(19): 4057-93.

Ji, K., Xing, C., Jiang, F., Xang, X., Guo, H., Nan, J., Qian, L., Yang, P., Lin, J., Li, M., Li, J., Liao, L., Tang, J. 2013. Benzo[a]pyrene induces oxidative stress and endothelial progenitor cell dysfunction via the activation of the NF- κ B pathway. *Int J Mol Med*. 31(4): 922-30.

Keystone, E.C., Wang, M.M., Layton, M., Hollis, S., McInnes, L.B., D1520C00001 Study Team. 2012. Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Ann Rheum Dis*. 71(1): 1630-5.

Khakh, B.S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B.F., North, R.A., Seguela, P., Voigt, M., Humphrey, P.P. 2001. International union of pharmacology: XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev*. 53(1): 107-18.

Kim, J.H., Stanbry, K.H., Walker, N.J., Trush, M.A., Strickland, P.T., Sutter, T.R. 1998. Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis*. 19(10): 1847-53.

Kinkel, M.D., Eames, S.C., Philipson, L.H., Prince, V.E. 2010. Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *J Vis Exp*. Doi: 10.3791/2126.

Kovary, K., Bravo, R. 1992. Existence of different fos/jun complexes during the go-to-g1 transition and during exponential role of fos protein. *Mol Cell Biol*. 12(11): 5015-23.

- Laknaur, A., Foster, T.L., Bobb, L.E., Ramesh, A., Ladson, G.M., Hood, D.B., Al-Henry, A., Thota, C. 2015. Altered expression of histone deacetylases, inflammatory cytokines and contractile-associated factors in uterine myometrium of Long Evans rats gestationally exposed to benzo[a]pyrene. *J Appl Toxicol*. Doi: 10.1002/jat.3216.
- Larazowski, E.R., Boucher, R.C., Harden, T.K. 2003. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol*. 64: 785-95.
- Latz, E., Xiao, T.S., Stutz, A. 2013. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. 13(6): 397-411.
- Leite, C.E., Maboni Lde, O., Cruz, F.F., Rosemberg, D.B., Zimmermann, F.F., Pereira, T.C., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Campos, M.M., Morrone, F.B., Battastini, A.M. 2013. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. *Toxicol Appl Pharmacol*. 272(3): 681-9.
- Lenertz, L.Y., Gavala, M.L., Zhu, Y., Bertics, P.J. 2011. Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X7, a critical regulator of immunologic, osteogenic and neurologic functions. *Immunol Res*. 50(1): 22-38.
- Ma, J.Q., Liu, C.M., Qin, Z.H., Jiang, J.H., Sun, Y.Z. 2011. Ganoderma applanatum terpenes protects mouse liver against benzo[a]pyrene-induced oxidative stress and inflammation. *Environ Toxicol Pharmacol*. 31(3): 460-8.
- Mariathasan, S., Monack, D.M. 2007. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev immunol*. 7(1): 31-40.
- Martini, F., Fernández, C., Tarazona, J.V, Pablos, M.V. 2012. Gene expression of heat shock protein 70, interleukin-1 β and tumor necrosis factor α as tools to identify immunotoxic effects on *Xenopus laevis*: a dose-response study with benzo[a]pyrene and its degradation products. *Environ Pollut*. 160(1): 28-33.
- Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 β . *Mol Cell*. 287: (417-26).
- Moore, H.A., Whitmore, D. 2014. Circadian rhythmicity and light sensitivity of the zebrafish brain. *PLoS One*. Doi: 10.1371/journal.pone.0086176.
- Moreau, M., Oullet, N., Ayott, P., Bouchard, M. 2015. Effects of intravenous benzo[a]pyrene dose administration on levels of exposure biomarkers, DNA adducts, and gene expression in rats. *J Toxicol Environ Health A*. 78(3): 166-84.

- Morgan, E. T., 2009. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 85(4): 434-8.
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., Núñez, G. 2013. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity.* 38(6): 1142-53.
- Murgia, M., Hanau, S., Pizzo, P., Rippa, M., Di Virgilio, F. 1993. Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *J Biol Chem.* 268(11): 8199-203.
- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J. 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem.* 279(23): 23847-50.
- Nebert, D.W., Dalton, T.P. 2006. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signaling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 6(12): 947-60.
- Nelson, D.W., Gregg, R.J., Kort, M.E., Perez-Medrano, A., Voight, E.A., Wang, Y., Grayson, G., Namovic M.T., Donnelly-Roberts, D.L., Niforatos, W., Honore, P., Jarvis, M.F., Faltynek, C.R., Varroll, W.A. 2006. Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzul-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J Med Chem.* 49(12): 3695-66.
- Nishina, H., Sato, H., Suzuki, T., Sato, M., Iba, H. 1990. Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(9): 3619-23.
- North, R.A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 82(4): 1013-67.
- Perregaux, D., Gabel, C.A. 1994. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem.* 269(21): 15195-203.
- Podechard, N., Lecureur, V., Ferrec, E.L., Guenon, I., Sparfel, L., Gilot, D., Gordon, J.R., Lagente, V., Fardel, O. 2008. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo[a]pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol Lett.* 177(2): 130-7.

- Qamar, W., Khan, A.Q., Khan, R., Lateef, A., Tahir, M., Rehman, M.U., Ali, F., Sultana, S. 2012 Benzo[a]pyrene-induced pulmonary inflammation, edema, surfactant dysfunction, and injuries in rats: alleviation by farnesol. *Exp Lung Res.* 38(1): 19-27.
- Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G., Dubyak, G.R. 2007. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol.* 179(3): 1913-25.
- Ralevic, V., Burnstock, G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 50: 413-92.
- Rauscher, F.R. 3rd, Sambucetti, L.C., Curran, T., Distel, R.J., Spiegelman, B.M. 1988. Common DNA binding site for FOS protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell.* 52(3): 471-80.
- Renton, K. W., 2004. Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. *Curr Drug Metab.* 5(3): 235-43.
- Robson, S.C., Kaczmarek, E., Siegel, J.B., Candinas, D., Koziak, K. 1997. Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J Exp Med.* 185: 153-63.
- Sankhwar, M., Sankhwar, S.N. 2014. Variations in CYP isoforms and bladder cancer: a superfamily paradigm. *Urol Oncol.* 32: 33-40.
- Schroder, K., Tschopp, J. 2010. The inflammasomes. *Cell.* 140(6): 821-32.
- Shimada, T., Hayes, C.L., Tamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P., Sutter, T.R. 1996. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* 56:2979-84.
- Silvestre, D.A., Gil, G.A., Tomasini, N., Bussolino, D.F., Caputto, B.L. 2010. Growth of peripheral and central nervous system tumor is supported by cytoplasmic c-Fos in human and mice. *PLoS One.* 5(3): e9544.
- Shimada, T., Gilliam, E.M., Oda, Y., Tsumura, F., Sutter, T.R., Guengerich, F.R., Inoue, K. 1999. Metabolism of benzo[a]pyrene to trans-7,8-dihydroxybenzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 1B1 and purified liver epoxide hydrolase. *Chem Res Toxicol.* 12(7): 623-9.
- Smerdová, L., Neca, J., Svobodová, J., Topinka, J., Schmuczerová, J., Kozubík, A., Machala, M., Vondráček, J. 2013. Inflammatory mediators accelerate metabolism of benzo[a]pyrene in rat alveolar type II cells: the role of enhanced cytochrome P450 1B1 expression. *Toxicology.* 314: 30-8.
- Soltoff, S.P., McMillian, M.K., Talamo B.R. 1992. ATP activates a cation-permeable pathway in rat parotid acinar cells. *AM J Physiol.* 262(4 pt 1): C934-40.

- Suplat-Wypych, D., Dygas, A., Baranska, J. 2010. 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP mediated calcium signaling in rat glioma C6 cells: role of the P2Y(2) nucleotide receptor. *Purinergic Signal*. 6(3): 317-25.
- Sutterwala, F.S., Ogura, Y., Szczepanik, M., Lara-Tejero, M., Lichtenberger, G.S., Grant, E.P., Bertin, J., Coyle, A.J., Galán, J.E., Askenase, P.W., Flavell, R.A. 2006. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*. 24(3): 317-27.
- Ting, J.P., Lovering, R.C., Alnemri, E.S., Bertin, J., Boss J.M., Davis, B.K., Flavell, R.A., Girardin, S.E., Godzik, A., Harton, J.A., Hoffman, H.M., Hugot, J.P., Inohara, N., Mackenzie, A., Maltais, L.J., Nunez, G., Ogura, Y., Otten, L.A., Philpott, D., Reed, J.C., Reith, W., Schreiber, S., Steimle, V, Ward, P.A. 2008. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*. 28(3): 285-7.
- Umannová, L., Machala, M., Topinka, J., Nováková, Z., Milcová, A., Kozubík, A., Vondráček, J. 2008. Tumor necrosis factor- α potentiates genotoxic effects of benzo[a]pyrene in rat liver epithelial cells through upregulation of cytochrome P450 1B1 expression. *Mutat Res*. 640(1-2): 162-9.
- Umannová, L., Machala, M., Topinka, J., Schmuczerová, J., Krčmář, P., Neča, J., Šujanová, K., Kozubík, A., Vondráček, J. 2011. Benzo[a]pyrene and tumor necrosis factor- α coordinately increase genotoxic damage and the production of proinflammatory mediators in alveolar epithelial type II cells. *Toxicol Lett*. 206(2): 121-9.
- Vasileiou, E., Montero, R.M., Turner, C.M., Vergoulas, G. 2010. P2X(7) receptor at the heart of disease. *Hippokratia*. 14(3): 155-63.
- Voncráček, J., Umannová, L., Machala, M. 2011. Interactions of the aryl hydrocarbon receptor with inflammatory mediators: beyond CYP1A regulation. *Curr Drug Metab*. 12(2): 89-103.
- Wilson, J.E. 1984. Some thoughts on the evolutionary basis for the prominent role of ATP and ADP in cellular energy metabolism. *J Theor Biol*. 111: 615-23.
- Xie, Y., Williams, C.D., McGill, M.R., Lebofsky, M., Ramachandran, A., Jaeschke, H. 2013. Purinergic receptor antagonist A438079 protects against acetaminophen-induced liver injury by inhibiting p450 isoenzymes, no by inflammasome activation. *Toxicol Sci*. 131(1): 325-35.
- Yaron, J.R., Gangaraju, S., Rao, M.Y., Kong, X., Zhang, L., Su, F., Tian, Y., Glenn, L., Meldrum, D.R. 2015. K⁺ regulates Ca²⁺ to drive inflammasome signaling: dynamic

visualization of ion flux in live cells. *Cell Death and Disease*. Doi: 10.1038/cddis.2015.277.

Yoshida, R., Suzuki, M. Sakaguchi, R., Hasegawa, E., Kimura, A., Shichita, T., Sekiya, T., Shiraishi, H., Shimoda, K., Yoshimura, A. 2012. Forced expression of stabilized c-Fos in dendritic cells reduces cytokine production and immune response *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 423(2): 247-52.

Zerial, M., Toschi, L., Ryseck, R.P., Schuermann, M., Müller, R., Bravo, R. 1989. The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J*. 8(3): 805-13.