



EXPRESSÃO GÊNICA DE CYP1A EM PEIXE-ZEBRA: UMA BREVE REVISÃO

Zenon Ratzlaff Júnior¹, Juliana Maria Fachinetto².

CYP1A gene expression in zebrafish: a brief review

Resumo: Os citocromos P450 (CYPs) compreendem uma superfamília de genes que codificam enzimas monooxigenase contendo heme que oxidam, hidrolisam ou reduzem compostos através da inserção de um átomo de oxigênio ao substrato, estando esses, diretamente envolvidos na desintoxicação e eliminação, além da ativação de uma ampla variedade de compostos. Como é o caso do CYP1A, o qual tende a desintoxicar químicos xenobióticos. A utilização de peixe-zebra em estudos ecotoxicológicos e do desenvolvimento cresceram nos últimos anos, sendo necessário um conhecimento explícito da expressão dos citocromos P450, principalmente do CYP1A, dado o seu papel central na biotransformação de xenobióticos. Este trabalho caracteriza-se por ser um estudo descritivo na modalidade de revisão bibliográfica com o objetivo de abordar a expressão gênica do gene relacionado à desintoxicação da fase 1 (citocromo P450 1A, CYP1A) em peixe-zebra. A pesquisa foi realizada nas bases eletrônicas de dados Lilacs, BIREME, PubMed, MedLine e Scielo, com os descritores CYP1A transcription zebrafish; CYP1A expression zebrafish; CYP1A zebrafish. O fígado é um dos principais órgãos de desintoxicação do corpo, sendo o CYP1A um dos principais genes CYPs expressos em peixe-zebra adulto. Algumas estratégias são utilizadas na identificação e quantificação de poluentes, uma delas são os biomarcadores, os quais possibilitam a correlação da intensidade da exposição com o efeito biológico da substância. Dentre alguns biomarcadores de metabolização de xenobióticos destacam-se a enzima de fase I 7-etoxirresorufina-O-deetilase (EROD) induzida por CYP1A. O uso da indução do CYP1A como técnica de avaliação tem aumentado nos últimos anos.

Palavras-chave: Biotransformação de xenobióticos. EROD. P450. *Danio rerio*.

Abstract: Cytochromes P450 (CYPs) comprise a superfamily of genes encoding oxidizing heme-containing monooxygenase enzymes, hydrolyze or reduce compounds by inserting an oxygen atom into the substrate, being these, directly involved in detoxification and elimination, and activation of a wide variety of compounds. As is the case with CYP1A, which tends to detoxify xenobiotic chemicals. The use of zebrafish in ecotoxicological and developmental studies has increased in recent years, being necessary an explicit knowledge of the expression of cytochrome P450, mainly from CYP1A, given its central role in xenobiotic biotransformation. This work is characterized by being a descriptive study in the literature review modality with the objective of addressing the gene expression of the phase 1 detoxification-related gene (cytochrome P450 1A, CYP1A) in zebrafish. The research was performed in the electronic databases Lilacs, BIREME, PubMed, MedLine and Scielo, with

¹ Acadêmico do curso de Ciências Biológicas, da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, Ijuí, Brasil. E-mail: ratzlaff.zenon@gmail.com

² Professora do curso de Ciências Biológicas da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, Ijuí, Brasil. E-mail: juliana.fachinetto@unijui.edu.br



the descriptors CYP1A transcription zebrafish; CYP1A expression zebrafish; CYP1A zebrafish. The liver is one of the body's main detoxifying organs, CYP1A being one of the major CYPs genes expressed in adult zebrafish. Some strategies are used to identify and quantify pollutants, one of them being biomarkers, which enable the correlation of exposure intensity with the biological effect of the substance. Among some biomarkers of xenobiotic metabolism stand out the phase enzyme I 7-eto-xirresorufina-O-deetilase (EROD) induced by CYP1A. The use of CYP1A induction as an evaluation technique has increased in recent years.

Keywords: Xenobiotic biotransformation. EROD. P450. *Danio rerio*.

1 INTRODUÇÃO

Os citocromos P450 (CYPs) compreendem uma superfamília grande e antiga de genes que codificam enzimas monooxigenase contendo heme que oxidam, hidrolisam ou reduzem compostos através da inserção de um átomo de oxigênio atmosférico ao substrato durante o ciclo de reação (NEBERT *et al.*, 1993; NELSON *et al.*, 1996). Os CYPs estão diretamente envolvidos na desintoxicação e eliminação, além da ativação de uma ampla variedade de compostos. Muitos CYPs têm papéis importantes nos processos fisiológicos básicos, como os CYP1, CYP2 e CYP3, os quais desempenham papéis críticos principalmente na catalisação da biotransformação de xenobióticos e, portanto, podem determinar a persistência e as ações de muitos medicamentos e substâncias tóxicas (KUBOTA *et al.*, 2019). Existem associações óbvias entre as ações de alguns CYPs e a toxicidade de alguns produtos químicos, por meio da ativação ou inativação destas moléculas (biotransformação de xenobióticos).

Os xenobióticos são substâncias estranhas ao organismo, que têm a capacidade de interagir com ele e exercer efeitos teratogênicos, mutagênicos e até carcinogênicos, como poluentes atmosféricos, metais pesados, microplásticos, fármacos, pesticidas, derivados de petróleo, entre outros (LANG; PELKONEN, 1999; PAN *et al.*, 2019). Todavia, os xenobióticos são considerados agentes tóxicos, uma vez que quebram o equilíbrio orgânico, ou seja, são substâncias que provocam mudanças na normal homeostase do corpo que o absorveu (LARINI, 1997).

Os mecanismos de biotransformação envolvem uma série de reações químicas dependentes de enzimas hepáticas. Uma substância xenobiótica pode sofrer uma ou mais transformações até que um derivado com uma possibilidade real de excreção seja produzido. Nesta segunda circunstância, a primeira reação é preparatória, produzindo um composto



intermediário (Fase 1) que ainda sofrerá uma nova reação, gerando, no final, metabólitos ativos ou inativos (Fase 2).

O peixe-zebra (*Danio rerio* Hamilton, 1822) principalmente em seus estágios embrionários e larvais, tem sido cada vez mais utilizado como organismo modelo para descoberta de medicamentos, testes de toxicidade no desenvolvimento e ecotoxicologia. O peixe-zebra adulto é usado como organismo modelo para comportamentos e estudos de expressão gênica porque seu genoma é totalmente caracterizado e sua fisiologia é paralela à dos seres humanos (CHEN *et al.*, 2009; PEITSARO *et al.*, 2007). A facilidade de análises genéticas e de manipulação torna o peixe-zebra altamente adequado para uma compreensão dos efeitos químicos nos organismos. Em peixe-zebra, como nos peixes em geral, as enzimas CYPs concentram-se principalmente no fígado, mas foram detectadas no rim, trato gastrointestinal e tecido branquial (VARANASI, 1989).

O uso do peixe-zebra como modelo de vertebrado não mamífero é de crescente importância nos campos da embriologia, biologia do desenvolvimento, farmacologia e toxicologia. O aumento do uso de peixe-zebra nessas pesquisas exige o conhecimento da expressão, função e regulação do gene CYP nessa espécie, principalmente do CYP1A, dado o papel central na biotransformação de xenobióticos. Deste modo, entender a suscetibilidade dos organismos aos efeitos de drogas e agentes tóxicos, bem como de sua fisiologia básica, depende dos conhecimentos acerca das funções dos CYPs. Sendo assim, esta revisão abordar a expressão gênica do gene relacionado à desintoxicação da fase 1 (citocromo P450 1A, CYP1A) em peixe-zebra, bem como, seus aspectos mais importantes.

2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Este é um estudo de revisão bibliográfica descritiva, desenvolvido através de pesquisa de artigos científicos indexada nas bases eletrônicas de dados Lilacs, BIREME, PubMed, MedLine e Scielo. A revisão respondeu ao tema específico: expressão do gene CYP1A em peixe-zebra. Sendo assim, nas bases eletrônicas, foram inseridos os seguintes descritores: CYP1A transcription zebrafish; CYP1A expression zebrafish; CYP1A zebrafish. O recorte temporal envolveu o período compreendido entre 1989 e 2019, abrangendo as publicações dos últimos 30 anos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

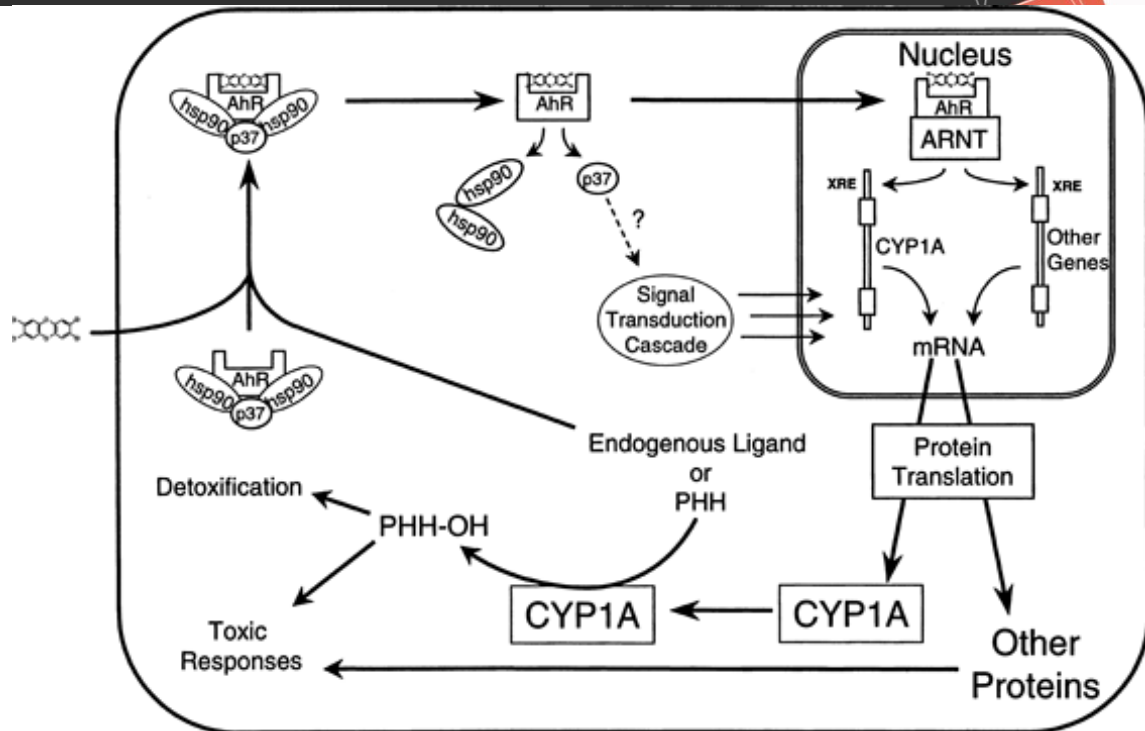


Diante das pesquisas realizadas, pode-se observar que o peixe-zebra tem cinco genes CYP1, incluindo CYP1A, CYP1B1, CYP1C1, CYP1C2 e CYP1D1. Alguns estudos comprovam que principalmente a isoforma do citocromo CYP1A tende a desintoxicar químicos xenobióticos correlacionados ao meio ambiente. O fígado é o órgão principal da expressão do transcrito do CYP1A no peixe-zebra adulto (JÖNSSON *et al.*, 2007). Segundo os resultados do trabalho de Kubota *et al.*, (2019), foi identificado um conjunto diversificado de genes CYP que são expressos no fígado de peixe-zebra adulto. O nível de expressão de CYP1A representou 5,0% do total de CYPs transcritos para fêmeas e 14,5% para machos.

Segundo Whyte *et al.*, (2000), o aspecto mais útil do CYP1A para fins de biomonitoramento é o aumento da produção nas células após exposição química, ou seja, por indutibilidade. As atividades do CYP1A são frequentemente indetectáveis em peixes não expostos ou de controle, mas tornam-se elevadas após exposição a PHHs / PAHs (hidrocarbonetos halogenados planares / hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) (STEGEMAN; LECH, 1991), por exemplo. Os eventos que levaram à indução dessa enzima por produtos químicos xenobióticos foram estudados extensivamente em sistemas de mamíferos (POLAND; BRADFIELD, 1992; NEBERT *et al.*, 1993; OKEY *et al.*, 1994), e acredita-se que esse mecanismo funcione da mesma forma em peixes (HAHN; KARCHNER, 1995).

A indução do CYP1A é mediada pela ligação de xenobióticos a um receptor de hidrocarboneto de arilo citosólico (AhR) (WHYTE *et al.*, 2000) (Figura 1).

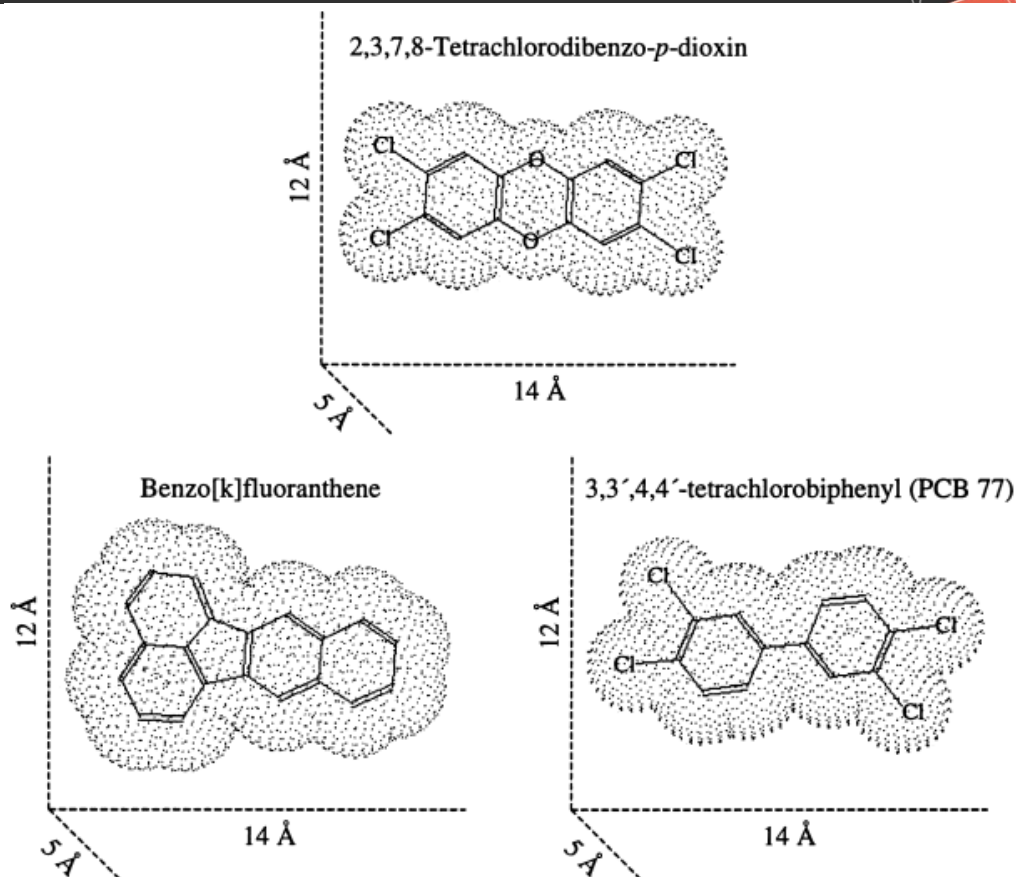
Figura 1 - Mecanismo proposto de toxicidade mediada por AhR. A transdução de sinal por ligantes tipo dioxina é mediada pelo AhR, que forma um fator de transcrição complexo com uma proteína translocadora nuclear de hidrocarboneto de arilo (ARNT). Este heterodímero se liga a sequências de DNA específicas chamadas elementos responsivos à dioxina (DRE). A ligação do heterodímero leva à indução de vários genes (a bateria do gene Ah), que por sua vez produzem uma variedade de produtos proteicos.



Fonte: Whyte *et al.*, (2000).

Os ligantes de AhR geralmente têm configurações isotéricas e são similares em estrutura a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8-TCDD), um indutor modelo CYP1A (WHYTE *et al.*, 2000) (Figura 2).

Figura 2 - Ligantes AhR representativos e modelo de caixa teórica do local de ligação de AhR. Moléculas com dimensões de 12 Å × 14 Å × 5 Å podem atuar como ligantes de AhR, mas outras propriedades químicas, como hidrofobicidade, capacidade de aceitação de elétrons e polarizabilidade podem influenciar a afinidade do receptor.



Fonte: Whyte *et al.*, (2000).

A ligação do receptor é seguida por uma série de eventos moleculares que levam à expressão de vários genes (incluindo o CYP1A) conhecidos como “bateria do gene Ah” (NEBERT *et al.*, 1993). Acredita-se que os efeitos tóxicos de compostos xenobióticos sejam mediados pelo AhR, com proteínas induzidas causando alterações na homeostase celular (DEVITO; BIRNBAUM, 1994). Em peixes, os estágios iniciais da vida parecem ser particularmente sensíveis aos ligantes de AhR (MEHRLE *et al.*, 1988; WALKER *et al.*, 1991), e evidências recentes indicam o envolvimento de enzimas CYP1A especificamente nessa resposta tóxica (CANTRELL *et al.*, 1996).

Biomarcadores em peixes podem indicar tanto a exposição de organismos a contaminantes (biomarcadores de exposição) quanto a magnitude do distúrbio causado em resposta a poluentes (biomarcadores de efeito) (CAJARAVILLE *et al.*, 2000). Entre os biomarcadores mais utilizados e recomendados estão as enzimas envolvidas no metabolismo de compostos tóxicos e sistemas de defesa antioxidante, pois fornecem informações importantes sobre a capacidade de defesa dos organismos, bem como a capacidade de biotransformação de compostos tóxicos (BURGEOT *et al.*, 1996).



A medição da atividade da etóxioresorufina-O-desetilase (EROD) em peixes é um biomarcador *in vivo* bem estabelecido de exposição a compostos xenobióticos (BUCHELI; FENT, 1995; HAHN; STEGEMAN, 1994).

EROD é um indicador altamente sensível de captação de contaminantes em peixes, fornecendo evidências de indução mediada por receptores de monooxigenase dependentes do citocromo P450 (especificamente a subfamília CYP1A) por substâncias químicas xenobióticas. Está ficando claro que o mecanismo de indução do CYP1A está intimamente relacionado, se não diretamente envolvido, a efeitos prejudiciais, como apoptose e mortalidade embrionária, observados em peixes expostos a contaminantes indutores do EROD (CANTRELL *et al.*, 1996).

Além da indução de xenobióticos, a atividade da EROD pode ser influenciada por um grande número de fatores abióticos e bióticos, como idade, fase reprodutiva e temperatura da água (ANDERSSON; FÖRLIN, 1992).

Na prática, a atividade do EROD descreve a taxa de desetilização mediada pelo CYP1A do substrato 7-etoxioresorufina (7-ER) para formar o produto resorufina. A atividade catalítica em relação a este substrato é uma indicação da quantidade de enzima presente e é medida como a concentração de resorufina produzida por mg de proteína por minuto (mol / mg / min) (KENNEDY; JONES, 1994). Como o metabolismo é geralmente mais alto no tecido hepático, o ensaio é tipicamente realizado usando fígado de peixe (WHYTE *et al.*, 2000).

4 CONCLUSÃO

De acordo com as pesquisa aqui realizada, os estudos de expressão dos genes CYP revelaram que CYP1A é um dos principais genes CYPs expressos no fígado de peixe-zebra adulto em ambos os sexos. No entanto, houve diferenças significativas de sexo nos níveis de transcrição para CYP1A, com os machos apresentando níveis de expressão mais altos do que os das fêmeas. O fígado é um dos principais órgãos de desintoxicação do corpo, sendo esperado que a maioria dos CYPs de metabolização de drogas e outros xenobióticos, como CYP1A, tenham alta expressão hepática.

Diferentes estratégias podem ser adotadas para se avaliar o nível de contaminação do meio aquático como, por exemplo, a identificação e quantificação dos poluentes presentes na água, em sedimentos e nos organismos. Atualmente, as análises ambientais se constituem em ensaios ecotoxicológicos. Em nível da organização biológica, as ferramentas de análise são



chamadas de biomarcadores, os quais possibilitam a correlação da intensidade da exposição com o efeito biológico da substância.

Várias são as vantagens do uso de biomarcadores nos estudos de monitoramento ambiental, tais como detectar as primeiras alterações nas respostas biológicas, evitando que os efeitos da intoxicação dos organismos cheguem a um ponto irreversível. Dentre alguns biomarcadores de metabolização de xenobióticos destacam-se a enzima de fase I 7-etoxirresorufina-O-deetilase (EROD) induzida por CYP1A. Ou seja, a atividade da isoforma 1A do citocromo P450 na conversão do substrato não fluorescente 7-etoxirresorufina em um produto fluorescente, a resorufina.

O uso da indução do CYP1A como técnica de avaliação tem aumentado nos últimos anos. Isso se deve principalmente à otimização de protocolos para a medição rápida e relativamente barata de sua atividade catalítica como EROD.

Sendo assim, esta revisão compila as últimas informações referentes à expressão do genes CYP1A em peixe-zebra, possibilitando assim uma base para estudos de ecotoxicologia com peixe-zebra.

REFERÊNCIAS

ANDERSSON, T.; FÖRLIN, L. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 1–19, 1 nov. 1992.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 201–268, 1 ago. 1995.

BURGEOT, T. et al. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 131, p. 125-141, 1996.

CAJARAVILLE, M.P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CANTRELL, S. M. et al. Embryotoxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): the embryonic vasculature is a physiological target for TCDD-induced DNA damage and apoptotic cell death in Medaka (*Orizias latipes*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 23–34, nov. 1996.

CHEN, Y. C. et al. Complementary developmental expression of the two tyrosine hydroxylase transcripts in zebrafish. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 132, p. 375–381. 2009.



- DEVITO M. J.; BIRNBAUM L. S. Toxicology of dioxins and related chemicals. In: **Schechter A (Ed.) Dioxins and Health**. New York: Plenum Press, p. 139–62, 1994.
- HAHN, M. E.; KARCHNER, S. I. Evolutionary conservation of the vertebrate Ah (dioxin) receptor: amplification and sequencing of the PAS domain of a teleost Ah receptor cDNA. **The Biochemical Journal**, v. 310 (Pt 2), p. 383–387, 1 set. 1995.
- HAHN, M. E.; STEGEMAN, J. J. Regulation of cytochrome P4501A1 in teleosts: sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the marine fish *Stenotomus chrysops*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 127, n. 2, p. 187–198, ago. 1994.
- JÖNSSON, M. E. et al. Basal and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in zebrafish. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 221, n. 1, p. 29–41, 15 maio 2007.
- KENNEDY, S. W.; JONES, S. P. Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. **Analytical Biochemistry**, v. 222, n. 1, p. 217–223, out. 1994.
- KUBOTA, A. et al. Transcriptional profiling of cytochrome P450 genes in the liver of adult zebrafish, *Danio rerio*. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 44, n. 5, p. 347–356, 2019.
- LANG, M.; PELKONEN, O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. **IARC scientific publications**, n. 148, p. 13–22, 1999.
- LARINI, L. **Toxicologia**. 3 ed., São Paulo: Manole, 1997.
- MEHRLE, P. M. et al. Toxicity and bioconcentration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in rainbow trout. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 47–62, 1988.
- NEBERT, D. W.; PUGA, A.; VASILIOU, V. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 685, p. 624–640, 23 jun. 1993.
- NELSON, D. R. et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v. 6, n. 1, p. 1–42, fev. 1996.
- OKEY, A. B.; RIDDICK, D. S.; HARPER, P. A. The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. **Toxicology Letters**, v. 70, n. 1, p. 1–22, jan. 1994.
- PAN, J. H. et al. Hepatic transcriptomics analysis reveals that fructose intervention downregulated xenobiotics metabolizing enzymes through aryl hydrocarbon receptor signaling suppression in C57BL/6N mice. **The British Journal of Nutrition**, p. 1–32, 2 jul. 2019.
- PEITSARO, N. et al. Identification of zebrafish histamine H1, H2 and H3 receptors and effects of histaminergic ligands on behavior. **Biochemical Pharmacology**, v.73, p. 1205–1214. 2007.



POLAND, A.; BRADFIELD, C. A brief review of the Ah locus. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 168, n. 2, p. 83–87, out. 1992.

STEGEMAN, J. J.; LECH, J. J. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 90, p. 101–109, jan. 1991.

VARANASI, U. **Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment**. CRC Press, Boca Raton (FL), p. 341, 1989.

WALKER, M. K. et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) Toxicity during Early Life Stage Development of Lake Trout (*Salvelinus namaycush*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48, n. 5, p. 875–883, 1 maio 1991.

WHYTE, J. J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 347–570, jul. 2000.