

## IDENTIFICACIÓN DE ISOFORMAS DEL GEN CITOCROMO P<sub>450</sub> (CYP) EN SANGRE PERIFÉRICA DE *CAIMAN LATIROSTRIS* Y ANÁLISIS DE SU POTENCIALIDAD COMO MARCADOR DE EXPOSICIÓN A XENOBIÓTICOS

Stringhini, Brunela<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-UNL  
Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal

Directora: Poletta, Gisela  
Codirectora: Odetti, Lucía

Área: Ciencias Biológicas

Palabras Claves: Yacaré overo, gen p450, expresión génica

### INTRODUCCIÓN

La superfamilia del citocromo P<sub>450</sub> (CYP) presenta una gran cantidad de genes que codifican enzimas P<sub>450</sub> (Uno *et al.*, 2018). Las CYP se encuentran presentes en todos los dominios de la vida y actúan generalmente como agentes oxidantes en una variedad de reacciones metabólicas y biosintéticas, que incluyen procesos de desintoxicación y regulación (Yamamoto *et al.*, 2018). Están involucradas en reacciones de mono oxigenación de una amplia gama de compuestos endógenos y exógenos en diversas especies de mamíferos y peces (Delescluse *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2013). Se ha demostrado que las familias CYP1, CYP2 y CYP3 son responsables de una variedad de funciones del metabolismo xenobiótico, principalmente en el hígado (Siroká *et al.*, 2004). La presencia y el nivel de expresión de estas enzimas influyen en la capacidad del tejido para metabolizar y/o desintoxicar los xenobióticos (Siroká *et al.*, 2004). Numerosos estudios de dichas isoformas han demostrado su utilidad como marcadores de expresión génica, estableciéndose como una herramienta útil para ensayos de biomonitoreo y ecotoxicología (Xing *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017). Particularmente, en varias especies de peces se han informado modificaciones en los niveles de expresión de las variantes del gen CYP como respuesta del organismo frente a la exposición a plaguicidas (Özdemira *et al.*, 2018; Velki *et al.*, 2019).

Los reptiles son modelos importantes en la historia evolutiva y son de gran importancia ecológica, sociológica y comercial (Alföldi *et al.*, 2011; John *et al.*, 2012). En Argentina, habitan dos especies de cocodrilianos y particularmente en la región centro-norte de la Provincia de Santa Fe (Argentina) se encuentra el yacaré overo (*Caiman latirostris*).

Título del proyecto: Identificación de nuevos marcadores moleculares para evaluación de poblaciones naturales de *Caiman latirostris* (yacaré overo) sometidas a estrés ambiental

Instrumento: PICT

Año de convocatoria: 2016

Organismo financiador: CONICET

Director/a: Dra. Gisela Poletta

En esta área, como en muchas otras de la región centro norte de Argentina, es de gran preocupación la constante exposición a plaguicidas que sufren las poblaciones naturales de esta especie. Diversos trabajos han reportado el efecto genotóxico, inmunotóxico y alteraciones enzimáticas que inducen los plaguicidas en crías y juveniles de *C. latirostris* observadas bajo condiciones experimentales (Poletta *et al.*, 2009; Siroski *et al.*, 2016; López González *et al.*, 2017; Burella *et al.*, 2018). La investigación sobre el metabolismo de los plaguicidas y las CYP en los cocodrilianos es escasa, lo que hace difícil evaluar los efectos tóxicos que pueden estar generando a ese nivel (Arukwe *et al.*, 2015) y no existen registros para nuestra especie de interés. A su vez, el diseño de cebadores (*primers*) para PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) y qPCR (Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real) es uno de los factores críticos a la hora de optimizar los ensayos para medir los niveles de expresión de genes de interés. En tal sentido, el presente trabajo pretende identificar isoformas del gen CYP para utilizarlo como marcador en ensayos de biomonitorio, mediante técnicas de PCR y qPCR a partir de muestras de sangre periférica de *C. latirostris*. Este sería el primer reporte de la utilización de este gen como marcador de exposición a xenobióticos en sangre, para todas las especies de cocodrilianos y, junto con los demás biomarcadores aplicados rutinariamente en esta especie, permitiría analizar en forma integrada, la respuesta inducida en los animales por diferentes xenobióticos de interés regional.

### OBJETIVOS

- Diseñar *primers* para el estudio de isoformas del gen CYP mediante PCR convencional y qPCR.
- Determinar la presencia/ausencia del gen CYP en sangre periférica de *C. latirostris* mediante la técnica de PCR convencional.
- Validar el gen CYP como potencial marcador de exposición a xenobióticos en sangre periférica de *C. latirostris* utilizando la técnica de qPCR.
- Formar recursos humanos calificados en el área de la Genética Toxicológica.

### METODOLOGÍA

Para este trabajo se utilizaron 8 ejemplares juveniles (10 meses de edad) de *C. latirostris* provenientes de dos nidos del programa de uso sustentable Proyecto Yacaré. Se tomaron 0,5 ml de sangre periférica de estos ejemplares mediante jeringas heparinizadas y agujas de 25G x 5/8 (Myburgh *et al.* 2014).

El ARN se extrajo mediante un protocolo adaptado para *C. latirostris* (López-González *et al.*, en prensa). Posteriormente, se realizó el tratamiento con DNasa I libre de ARNasa (PBL Productos Bio-Lógicos) para eliminar cualquier remanente de ADN genómico. La calidad del ARN de cada muestra, se verificó mediante la medición de la absorbancia a 260-280 nm y la realización de un gel de agarosa al 2%. Finalmente, se usó el kit RevertAid First Strand (Thermo Scientific®) para la síntesis de ADNc (RT).

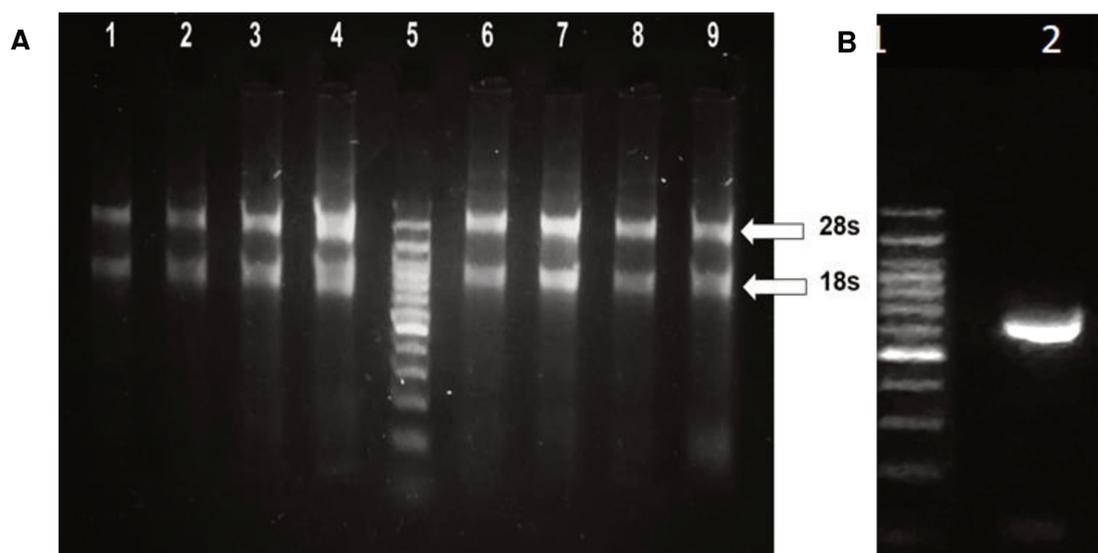
Se diseñaron dos *primers* a través de la página de Integrated DNA Technologies (IDT-<https://www.idtdna.com/pages>) a partir del genoma de *Alligator sinensis* (p450 ARNm, GenBank: XM\_014523553.1): p450A (F: GGAATAAAAGCTCCTGCC; R: CCAACATGGCTAAATGCTGGC) y p450B (F: TTTCTGTGACCTCTGGCATC; R: CGAAGATGTGCAAAGATGGC)

La PCR convencional se realizó siguiendo el protocolo de (Paravani *et al.*, 2020), y para la qPCR se siguió el protocolo descrito por (Odetti *et al.*, 2021) específico para *C. latirostris*. Se realizó un pool de ADNc (mezcla de ADNc de todas las muestras) donde se midió la relación de absorbancia 260-280 a través de un espectrofotómetro NanoDrop. Se llevó a cabo una curva estándar mediante diluciones seriadas. Se utilizó el reactivo 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus y se utilizó el equipo StepOne™- 48 PCR en tiempo real (Biosystems Applied™).

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La concentración media de ARN en sangre después del tratamiento con ADNsa fue de  $87,23 \pm 6,02$  ng / $\mu$ l (media  $\pm$  EE – Figura 1A). La relación de densidad óptica A260-280 nm fue de  $1,89 \pm 0,06$  (media  $\pm$  EE). El gel de agarosa demostró buena integridad de ARN para todas las muestras, observándose dos bandas bien definidas correspondientes al ARNr 28s y 18s (Figura 1A).

En cuanto a los resultados obtenidos en la PCR convencional, se obtuvo un producto compatible con el amplicón de p450A (674 pb) observado como una banda sin inespecificidades en el gel de agarosa al 2% (Figura 1B).



**Figura 1. A-** Gel de agarosa al 2% con TAE 1x que muestra la extracción de ARN obtenida de sangre de 8 crías de *C. latirostris*, a partir del protocolo adaptado para la especie. Calles: 1–4 y 6–9: extracción de ARN de sangre de distintos animales; Calle 5: marcador de tamaño molecular de 100 pb (Plus DNA - TransGen Biotech). **B-** Gel de agarosa (2%) con TAE 1x que muestra el producto de PCR específico para p450: Calle 1: marcador de tamaño molecular de 100 pb (Plus DNA - TransGen Biotech); calle 2: p450A- 674 pb.

Los resultados permitieron identificar la presencia del gen p450, isoforma 1, lo que se considera un resultado muy importante teniendo en cuenta la falta de resultados previos en la especie, siendo este un hallazgo de gran potencial para futuros estudios.

Con respecto a la qPCR, se obtuvieron resultados inespecíficos, por lo que se considera que es necesario realizar el diseño de nuevos *primers* y/o cambiar las condiciones de la qPCR para poder validarlo como posible marcador de expresión génica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Uno, T., Ishizukab, M., Itakura T.** 2018. Cytochrome P<sub>450</sub> (CYP) in fish. environmental toxicology and pharmacology 34, 1-13.
- Yamamoto, F.A., Diamante, G.F., Santana, M.S., Santos, D.R., Bombardeli, D.R., Martins, C.C., Oliveira Ribeiro, C.A., Schlenk, D.** 2018. Alterations of cytochrome P<sub>450</sub> and the occurrence of persistent organic pollutants in tilapia caged in the reservoirs of the Iguacu River. Environmental Pollution 240, 670-682.
- Delescluse, C., Ledirac, N., Li, R., Piechoky, M., Hines, R., Grido. Rahmani, R.,** 2001. Induction of cytochrome P<sub>450</sub> 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. Biochemical Pharmacology 61, 399-407.
- Siroká, Z., J. Drastichová, J.** 2004. Biochemical Markers of Aquatic Environment Contamination Cytochrome P<sub>450</sub> in Fish. AReview.Acta Vet. Brno 73, 123-132.
- Xing, H., Zhang, Z., Yao, H., Liu, T.Wang, L. Xu, S. Li, S.** 2014. Effects of atrazine and chlorpyrifos on cytochrome P<sub>450</sub> in common carp liver. Chemosphere 104, 244-250
- Özdemira, S., Altunb, S., Arslanc, H.** 2018. Imidacloprid exposure cause the histopathological changes, activation of TNF- $\alpha$ , iNOS, 8-OHdG biomarkers, and alteration of caspase 3, iNOS, CYP1A, MT1 gene expression levels in common carp (*Cyprinus carpio L.*). Toxicology Reports 5, 125-133.
- Zhang, L., Dong, X., Wang, C., Zuo, Z., Chen, M.** 2017. Bioaccumulation and the expression of hepatic cytochrome P450 genes in marine medaka (*Oryzias melastigma*) exposed to difenoconazole. journal of environmental sciences 52, 98 – 104.
- Velki, M., Lackmann, C., Barranco, C., Ereño A. A., Rainieri, S., Hollert, H., Thomas-Benjamin, S.** 2019. Pesticides diazinon and diuron increase glutathione levels and affect multixenobiotic resistance activity and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. Environ Sci Eur 31:4.
- Alföldi, J., Di Palma, F., Grabherr, M.** 2011. The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. Nature 477, 587-591
- St John, JA, Braun, EL, Isberg, SR.** 2012. Sequencing three crocodylian genomes to illuminate the evolution of archosaurs and amniotes. Genome Biol. 13, 415.
- Siroski, P. A.; Poletta, G. L.; Latorre, M. A.; Merchant, M. E.; Ortega, H.H.; Mudry, M. D.** 2016. Immunotoxicity of commercial-mixed glyphosate in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) Chemic-Biol. Interac 244, 64-70.
- Poletta GL., Larriera A., Kleinsorge E., Mudry MD.,** 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. Mutation Research 672:95-102
- Burella, P M; Odetti, L .M; Simoniello, M. F; Poletta, G.L.** 2018. Oxidative damage and antioxidant defense in *Caiman latirostris* (Broad snouted caiman) exposed *in ovo* to pesticide formulations Ecotoxicology and Environmental Safety 2018,161, 437-443.
- López González E.C., Larriera A., Siroski P.A., Poletta G.L.,** 2017. Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. Ecotoxicol Environ Saf. 136: 84-91.
- Arukwe, A., Rosbak, R., Adeogum, A., Langerb,H., Venter, A., Myburg, J., Botha, C., Benedettu, M., Regoli, F.** 2015. Biotransformation and Oxidative Stress Responses in Captive Nile Crocodile (*Crocodylus niloticus*) Exposed to Organic Contaminants from the Natural Environment in South Africa. PLOS ONE
- Myburgh JG., Kirberger RM., Steyl JCA., Soley JT., Booyse DG., Huchzermeyer FW., Lowers RH., Guillette LJ.,** 2014. The postoccipital spinal venous sinus of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*): its anatomy and use for blood sample collection and intravenous infusions. J S Afr Vet Assoc 85:1-10
- López González E., Odetti LM., Poletta GL., Densolw N., Kroll., Siroski PA., Parapachu Marcó MV.,** 2020. Optimizing protocols for high-quality RNA extraction from blood and liver tissues of the Broad-snouted caiman. Russian journal of herpetology. *In press.*