

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROTÓXICOS INDUZIDOS POR
BENZO[a]PIRENO SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E
BIOQUÍMICOS

ÉRICA SANTOS MACIEL

PORTO ALEGRE

2012

ÉRICA SANTOS MACIEL

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROTÓXICOS INDUZIDOS POR
BENZO[a]PIRENO SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E
BIOQUÍMICOS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências, como
requisito para obtenção do título de Mestre
em Neurociências

Orientadora:

Profa. Dra. Mirna Bainy Leal

PORTO ALEGRE

2012

Às pessoas mais importantes da minha vida:

Meu pai, minha mãe e meus irmãos.

“Live and let die”

Paul McCartney

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Chico e Lena, pelo apoio incondicional, amor, incentivo nas horas difíceis, por sempre acreditarem na minha capacidade e me ensinar a correr atrás dos meus sonhos com muita garra e determinação.

Aos meus irmãos, Maíza, Roger e Laíz por me apoiaram e incentivaram sempre, amo vocês incondicionalmente, hoje, amanhã e pela eternidade.

Ao Henrique, pelo companheirismo nestes 2 anos de mestrado, por aguentar meus “chiliques” e tentar ajudar, mesmo não entendendo muito o que eu estava falando sobre neurociências.

À minha orientadora, professora Mirna Bairy Leal, pela parceria, compreensão, ensinamentos e paciência. Por se fazer presente em uma hora muito difícil de minha vida, deixando assim claro, que a nossa parceria vai muito além dos experimentos e da bancada.

Às sempre presentes, Gabriela e Rebeca, pela troca de conhecimentos, ajuda e amizade. Com certeza vocês fizeram essa jornada parecer menos árdua e muito mais alegre. A Jana, que apesar de ter pouco tempo livre, mesmo assim se fez presente e ajudou muito.

Aos amigos do laboratório de toxicologia da Faculdade de Farmácia, pela disposição em ajudar e parceria nas horas boas e ruins: Rachel, Fernando, Natália, Gabriela Goethel, Bruna e demais colegas. A professora Solange Garcia, por me disponibilizar este pessoal todo, que contribuíram para que este projeto se concretizasse.

A professora Flávia Thiesen por toda a ajuda na primeira etapa deste trabalho, que embora não concluída, serviu de base para esta dissertação. E a Karine, por sua disponibilidade em nos ensinar e acompanhar nesta etapa.

A professora Mirian Salvador e sua aluna Cátia Branco pela parceria e disponibilidade, acrescentando muito neste trabalho.

Aos professores C A e Rodrigo Leal pelas sugestões e acréscimos neste trabalho, fazendo assim uma grande diferença no resultado final.

As amigas: Regina, Liliana, Daniela, Gabriela, Giovana, Denise e Ana, pelas horas de descontração e risadas. Pela amizade sincera e duradora. A Regina, em especial, que além da amizade, ajudou na realização de mais de uma etapa deste projeto.

Ao Instituto Nacional de Análise Integrada do Risco Ambiental (INCT), coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva (USP).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à PROPESQ/UFRGS pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

APRESENTAÇÃO

Os resultados desta dissertação de mestrado estão apresentados sob a forma de três artigos científicos a serem submetidos aos periódicos: *Revista Brasileira de Toxicologia*, *Food and Chemical Toxicology* e *Archives of Toxicology*. Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se nos próprios artigos.

Os itens Introdução e Discussão desta dissertação apresentam bases teóricas e comentários sobre os resultados contidos nos artigos científicos. O item Referências Bibliográficas se refere apenas as referências usadas nos tópicos Introdução e Discussão.

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
1.1 Benzo[a]pireno	5
1.2 Metabolização, carcinogênese e mutagênese.....	8
1.3 Benzo[a]pireno e estresse oxidativo	11
1.4 Benzo[a]pireno e Sistema Nervoso Central.....	12
1.5. Astrócitos.....	13
1.6 Proteína glial fibrilar ácida	14
1.7 Proteína S100B	15
1.8 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs).....	16
2. OBJETIVOS	18
PARTE II	19
CAPÍTULO I	20
"AVALIAÇÃO DE EFEITOS COMPORTAMENTAIS E DANO AO DNA INDUZIDOS POR BENZO[a]PIRENO EM RATAS APÓS ADMINISTRAÇÃO SUBCRÔNICA."	
CAPÍTULO II	42
"BEHAVIORS ALTERATIONS AND INDUCTION OF DNA DAMAGE AFTER SUBCHRONIC ORAL ADMINISTRATION OF BENZO[a]PYRENE."	
CAPITULO III	66
"BEHAVIORAL CHANGES AND NEUROCHEMICAL ALTERATIONS IN RATS SUBMITTED TO SUBCHRONIC ORAL ADMINISTRATION OF BENZO[a]PYRENE."	
PARTE III	99
DISCUSSÃO.....	100
CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

PARTE I

Lista de Abreviaturas

AhR - receptor aril hidrocarboneto

BaP – benzo[a]pireno

BPDE - BP-7,8-diol-9,10-epóxido

CYP- 450 – citocromo P-450

DNA – ácido desoxirribonucleico

ERK – cinase regulada por sinal extracelular

GFAP – proteína glial fibrilar ácida

HPAs – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

JNK - cinase c-Jun e N-terminal

LCR – líquido cefalorraquidiano

MAPK – proteínas cinases ativadas por mitógenos

SNC – sistema nervoso central

Resumo

Benzo[a]pireno (BaP) é um contaminante ambiental formado durante a combustão incompleta ou pirólise de material orgânico. O papel do BaP como um potente agente mutagênico e carcinogênico está bem definido, no entanto, poucos estudos foram publicados relacionados aos efeitos neurotóxicos provocados por este composto. Devido a presença de BaP como contaminante de alimentos e água, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da administração subcrônica oral de BaP, nas concentrações de 1 mg/kg e 2 mg/kg, em ratos machos e fêmeas sobre parâmetros comportamentais (atividade locomotora e memória de reconhecimento de objetos), dano ao DNA através do ensaio cometa, medida do conteúdo e secreção da proteína S100B, medida de GFAP e alterações na via das MAPKs (ERK1/2, JNK1/2 and p38^{MAPK}). As duas doses utilizadas neste estudo são equivalentes aos níveis de contaminação em fumantes, consumidores de grandes quantidades de produtos como carne defumada, grelhados e peixes, ou mesmo em indivíduos com alta exposição ocupacional. Como resultados, encontramos, que a atividade locomotora aumentou nos animais tratados com BaP, tanto os machos como as fêmeas. No teste de reconhecimento de objetos, os machos apresentaram um déficit na memória de curta duração, memória esta não testada no grupo das fêmeas. O dano ao DNA foi significativamente maior nos animais tratados com BaP, onde foi observado danos de classe três e quatro, os mais graves. No imunoc conteúdo de GFAP os animais tratados com BaP apresentaram uma tendência de aumento de astrogliose hipocampal, que provavelmente poderá ser confirmada se aumentarmos o tempo de administração. A secreção de S100B apresentou-se alterada tanto no líquido quanto no soro, a qual pode atuar tanto na sinalização neurônio-astrócito, em condições fisiológicas ou patológicas, quanto em diversas doenças neurodegenerativas. Foi observado também alteração na via das MAPKs, onde o tratamento com BaP diminuiu a fosforilação da ERK2 hipocampal, não alterando as demais testadas. O BaP foi capaz de induzir danos ao DNA, alterar a atividade locomotora, prejudicar a memória e alterar parâmetros neuroquímicos dos animais, mesmo em uma concentração encontrada como contaminante de alimentos e água, apontando para a necessidade de uma legislação mais eficiente para este composto, visto que pode acarretar sérios problemas à saúde.

Abstract

Benzo[a]pyrene (BaP) is an environmental contaminant formed during incomplete combustion or pyrolysis of organic material. The role of the BaP as a potent mutagenic and carcinogenic agent is well defined; however, few studies have been published related to the neurotoxic effects of BaP. Due to the presence of BaP as a contaminant of food and water, the objective of this study was to investigate the effects of subchronic oral administration of BaP, concentrations of 1mg/kg and 2mg/kg, in male and female rats on behavioral parameters (locomotor activity and object recognition memory), DNA damage through comet assay, as the content and secretion of S100B, measure of GFAP and changes in the pathway of MAPKs (ERK1/2, JNK1/2 and p38^{MAPK}). The two doses used in this study are equivalent to the contamination levels in smokers, consumers of large quantities of products such as smoked meat, grilled meats and fish, or even in individuals with high occupational exposure. As a result, there was an increased locomotor activity in both males and females treated with BaP. In the object recognition test, males showed a deficit in short-term memory. This parameter was not tested in the group of females. The DNA damage index, evaluated by the nucleus fragment migration (DNA grade 1-4) was significantly increased in animals treated with BaP, due to the higher presence of grade 3-4 of DNA tail length. In immunohistochemistry GFAP, animals treated with BaP showed a trend of increased astrogliosis hippocampal, which can probably be confirmed if we increase the time of administration. The secretion of S100B showed changes both in serum and cerebrospinal fluid, which can act in neuron-astrocyte signaling in physiological or pathological conditions, and in various neurodegenerative diseases. It was also observed changes in the MAPK pathway, whereas treatment with BaP decreased the phosphorylation of ERK2 hippocampal, without altering the others tested. BaP was able to induce DNA damage, alteration of locomotor activity, impair memory, and changes neurochemical parameters of the animals, even at a concentration found as a contaminant of food and water, pointing to the need for legislation more efficient for this compound, since it can cause serious health problems.

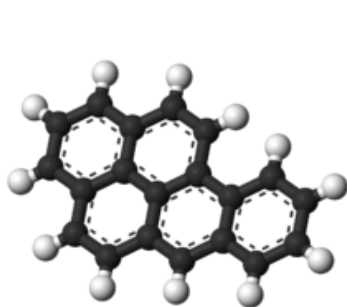
1. INTRODUÇÃO

1.1 Benzo[a]pireno

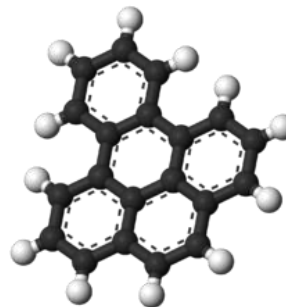
Poluentes orgânicos persistentes (POPs) são poluentes ambientais resistentes à degradação e com grande impacto na saúde humana (Ritter, et al., 1995). Dentre estes, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) destacam-se por serem compostos químicos, com relevante toxicidade, detectados tanto em alimentos como em bebidas, sendo estas, uma das principais fontes de exposição humana a estes compostos (Camargo & Toledo, 2002a; European Commission, 2002).

Os HPAs representam uma família de mais de 100 compostos orgânicos, formados por carbono e hidrogênio, contendo 2 ou mais anéis aromáticos condensados. O Benzo[a]pireno (BaP), dentre os HPAs, é um dos componentes mais conhecidos e estudados. Assim como os demais HPAs, é um produto proveniente da combustão incompleta de matéria orgânica, presente na fumaça do cigarro e da madeira, liberado como produto de emissão de motores a diesel e a gasolina e como produto da queima de carvão, etc, sendo, portanto um dos componentes da poluição urbana (ATSDR, 1995), contaminando solos, ar, água e alimentos.

Na natureza, o benzopireno encontra-se principalmente sob a forma de dois isômeros estruturais, benzo[a]pireno e benzo[e]pireno. O isômero benzo[a]pireno é o foco da maioria dos estudos por apresentar maiores concentrações no ambiente e por ter maiores efeitos mutagênicos e carcinogênicos em relação ao benzo[e]pireno (Wood and Levin, 1979). A figura 1 apresenta os dois isômeros estruturais de benzopireno.



Benzo[a]pireno



Benzo[e]pireno

Figura 1. Isômeros estruturais de benzopireno

De acordo com a estrutura, BaP apresenta fórmula molecular $C_{20}H_{12}$ que resulta em um elevado peso molecular (252,3). Possui aparência de cristais amarelo-pálido em forma de agulhas e sofre foto-radiação quando exposto à luz solar ou radiação fluorescente. Como os demais HPAs, o BaP é lipossolúvel, assim, em sistemas aquosos tende a concentrar-se em sedimentos ou permanecer associado à matéria orgânica em suspensão (Pereira Netto et al., 2000).

Segundo a recomendação da *International Union Pure and Applied Chemistry*, IUPAC, a grafia correta é benzo[a]pireno, enquanto que o *Chemical Abstract* adota benzo(a)pireno (Merck Index 1989).

Inúmeros estudos avaliam a contaminação de alimentos e bebidas por substâncias tóxicas como o BaP. A contaminação de alimentos e bebidas por BaP ocorre por meio de duas fontes principais: fontes naturais (processos geoquímicos, atividades vulcânicas e biossíntese por algas) e fontes antropogênicas, que são decorrentes da ação humana (queimadas em florestas; atividades industriais como defumação, secagem direta com madeira e torrefação; e poluição ambiental como tráfego, sistemas de aquecimento e vazamentos de óleo) (Bettin e Franco, 2005).

No Brasil, a legislação vigente estabelece limite máximo de BaP apenas para água de consumo ($0,7 \mu\text{g/L}$) (Brasil, 2004) e aroma de fumaça ($0,03 \mu\text{g/kg}$ de

produto final) (Brasil, 2007). Em alguns países, um número restrito de alimentos possui limites estabelecidos de BaP (Simko, 2002), como o caso da Alemanha, Áustria e Polônia, onde o teor máximo permitido de BaP em carnes defumadas é de 1µg/Kg sendo este valor usado como limite referencial para avaliar a contaminação de outros alimentos. Para óleos e gorduras, as indústrias alemãs recomendam seus próprios limites: a soma dos resíduos dos HPAs leves não deve exceder a 25 µg/kg, enquanto que a soma dos HPAs pesados, que inclui o BaP, deve permanecer abaixo de 5 µg/Kg (Camargo e Toledo, 2002b).

De acordo com a decisão do Comitê Científico da Alimentação Humana, da Comunidade Européia (CE), os níveis de HPAs e de BaP nos gêneros alimentícios devem ser reduzidos a concentrações tão baixas quanto possível. Dessa forma, através do Regulamento (CE) nº 208, de 04 de fevereiro de 2005, este Comitê determinou que se utilizasse o BaP como marcador relativo à ocorrência de outros HPAs cancerígenos e determinou limites máximos para este contaminante para alguns tipos de alimentos. A tabela a seguir apresenta tais valores (EC, 2005; Caruso, 2007):

Tabela 1: Níveis máximos de BaP em alguns tipos alimentares (em µg/kg de peso fresco), de acordo com o Regulamento (CE) nº 208, de 04 de fevereiro de 2005, da Comunidade Européia.

Produto alimentício	B(a)P (µg/Kg de peso fresco)
Óleos e gorduras	2,0
Alimentos para lactentes e crianças	1,0
Carnes defumadas e produtos defumados à base de carnes	5,0
Partes comestíveis de peixes defumados	5,0
Partes comestíveis de peixes	2,0
Moluscos bivalves	10,0
Crustáceos e cefalópodes	5,0

FONTE: Caruso (2007).

1.2 Metabolização, carcinogênese e mutagênese

Evidências epidemiológicas suportam uma associação entre a exposição ao BaP e a incidência de câncer em seres humanos (IARC, 1973). Após absorvido, o BaP é metabolizado no fígado e pulmões pelas enzimas do Citocromo P-450 (CYP-450) monooxigenases, como CYP1A1 e CYP1B1. Dois estudos demonstraram que CYP1A1 é a principal enzima responsável pela detoxificação do BaP administrado por via oral, enquanto CYP1B1 é a principal enzima responsável pela toxicidade química induzida por BaP (Uno et al., 2004, 2006). O pulmão é mais suscetível à carcinogênese induzida por BaP em relação ao fígado, sugerindo que a resposta ao BaP neste dois órgãos envolvam diferentes vias moleculares (Wattenberg & Leong, 1970). A toxicidade do BaP é provocada por sua potente ação pró-carcinogênica, uma vez que alguns dos seus metabólitos intermediários são intercalantes de DNA e, portanto, agentes mutagênicos/oncogênicos.

Três principais vias metabólicas que produzem intermediários reativos de HPA (entre eles BaP) foram descritas: (1) diol-epóxidos eletrofílicos resultantes da oxidação sequencial de HPAs pelas enzimas do citocromo P-450 (CYP-450), seguidas de hidrólises resultando em óxido arenos por epóxido hidrolases microsossomais e uma segunda oxidação catalisada pela CYP-450, (2) oxidação de um elétron dos HPAs pela CYP peroxidase produzindo um cátion radical, (3) HPA-o-quinonas a partir de ações sequenciais da CYP1A1, epóxido-hidrolases, diidrodiol desidrogenases e tautomerização entre o cetol e o catecol. Redução do catecol produz um radical aniôn o-semiquinona que sofre redução adicional para o-quinona (Xue & Warshawsky, 2005).

As duas primeiras vias produzem eletrófilos que podem ligar-se covalentemente ao DNA e provocar câncer. A via de HPA-o-quinona, além de formar

adutos de DNA, libera espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem produzir estresse oxidativo.

Os efeitos fisiológicos do BaP dependem da ativação funcional do receptor aril hidrocarboneto (AhR) (Schmidt, Bradfield,1996). A Aril Hidrocarboneto Hidroxilase (HHA), componente do sistema de oxidases de função mista microsomal, é uma enzima conhecida por atuar na metabolização de drogas, carcinógenos ambientais, agentes mutagênicos, teratogênicos e outros xenobióticos. Através de sua ativação é que são formados os intermediários reativos oxigenados tóxicos, como os diolepóxidos, que formam os adutos de DNA (Ramesh, et al., 2000). BaP mostrou-se um potente indutor desta enzima em um estudo onde foi adicionado à ração de ratos (Ramesh et al., 2000).

O metabólito intermediário BP-7,8-diol-9,10-epóxido, conhecido pela sigla BPDE, é a forma carcinogênica principal do BaP, ligando-se ao nitrogênio da deoxiguanosina ou deoxiadenosina do DNA (Chiapperino, 2005).

O BaP é considerado um carcinógeno completo, ou seja, produz a iniciação e a promoção da carcinogênese (Halliwell e Gutteridge,1989). Devido a esta característica, o BaP, em altas concentrações, vem sendo utilizado em diversos estudos como modelo de carcinogênese gástrica (Agha et al, 2001; Goyal et al., 2010), de câncer de pulmão (Kamaraj et al., 2009; Paul et al, 2011; Ravichandran et al., 2011) e de pele (Shimizu et al., 2000).

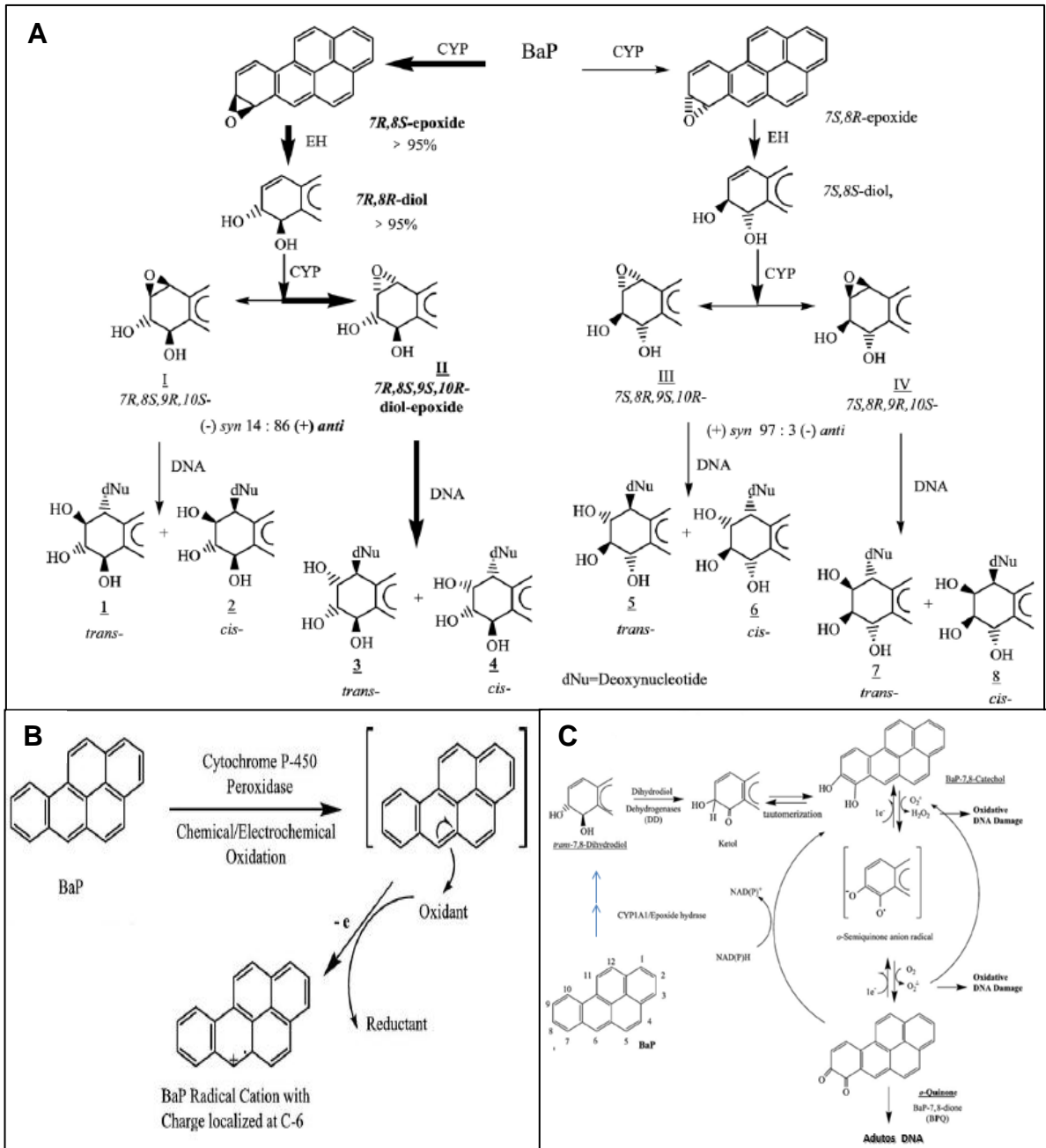


Figura 2. Três principais vias de metabolização de BaP. Após absorção pelas células, o BaP é metabolicamente ativado pelas enzimas do Citocromo P450. A) Diol-epóxidos eletrofílicos, B) Formação do cátion radical, C) Ativação metabólica via formação de o-quinonas. Após metabolização, BaP torna-se reativo com grupos nucleofílicos presentes em macromoléculas celulares, formando aduto de DNA ou liberando espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo (Xue & Warshawsky, 2005).

1.3 Benzo[a]pireno e estresse oxidativo

Muitas das substâncias às quais o ser humano se expõe, como o BaP, geram intracelularmente espécies reativas de oxigênio, favorecendo a ocorrência de lesões em biomoléculas, como os lipídios, as proteínas e o DNA. O acúmulo destas lesões tem sido descrito no processo de envelhecimento, além de também estarem envolvidas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Kazantsev, 2007). Assim, a investigação do papel do estresse oxidativo na toxicidade de xenobióticos, como os poluentes ambientais torna-se um assunto importante e atual. Além disso, os estudos toxicológicos pré-clínicos têm o propósito de buscar informações sobre as concentrações de substâncias capazes de provocar efeitos tóxicos e identificar órgãos alvo suscetíveis a estes efeitos.

O BaP administrado oralmente nos roedores em doses elevadas ($\geq 25\text{mg/kg}$), diminuiu a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px), bem como aumentou a peroxidação lipídica em hipocampo e estriado (Saunders et al, 2006; Kim & Lee, 1997).

Em cultura celular de queratinócitos humanos, o BaP mostrou alta afinidade pelo receptor aril hidrocarboneto (AhR), e a ativação deste aumentou as espécies reativas de oxigênio (ROS) e interleucina-8 (IL-8). A inibição do receptor diminuiu a produção de ROS e IL-8, sugerindo que estas respostas sejam fortemente dependentes da via de sinalização de AhR. Como o BaP é o principal HPA da fumaça do cigarro, esta associação (BaP-AhR-ROS-IL-8) pode explicar em parte, porque o tabagismo agrava doenças de pele relacionadas com IL-8 (Tsuji et al., 2011).

1.4 Benzo[a]pireno e Sistema Nervoso Central

O cérebro, por ter sua constituição rica em lipídios, pode ser vulnerável a danos causados pela exposição ao BaP. Estudos anteriores demonstraram que o BaP é um produto neurotóxico, atravessando a barreira hematoencefálica e se distribuindo em várias regiões do cérebro de ratos (Das et al.,1985, Yan et al.,2010) alterando, por exemplo, os níveis das aminas biogênicas (noradrenalina, dopamina e serotonina) e enzimas relacionadas (tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase) em determinadas regiões cerebrais (Jayasekara, 1992). BaP é capaz também de atravessar a placenta e causar danos a prole em desenvolvimento. Ratos filhos de mães expostas ao BaP durante a gestação, apresentaram uma diminuição do mRNA do receptor NMDA de glutamato e também do mRNA da proteína associada ao citoesqueleto (ARC) (Wormley et al., 2004), e a exposição transplacentária de BaP inalado por ratas prenhas alterou a sobrevivência fetal e os hormônios relacionados com a gravidez (Hood et al, 2000;. Archibong et al, 2002).

Mudanças comportamentais são frequentemente os primeiros sinais de exposição a efeitos neurotóxicos. Estudos em animais utilizando doses e vias de administração diferentes, mostraram que BAP foi capaz de causar alterações comportamentais e neuroquímica: empregando o teste do labirinto aquático de Morris, mostraram que BaP prejudica o aprendizado e a memória (Xia et ai, 2011; Chengzi et al., 2011), diminuição da atividade motora, fraqueza neuromuscular, anormalidades fisiológicas e autonômicas e diminuição da capacidade de resposta a estímulos sensoriais (Saunders et al, 2001; 2002; 2006), mudanças no sistema de neurotransmissores do hipocampo (Xia et al, 2011) e graves prejuízos para os neurônios do hipocampo (Chengzi et al., 2011).

1.5. Astrócitos

O sistema nervoso central é constituído de diferentes tipos celulares: neurônios e glia. São categorias amplas, as quais apresentam muitos tipos celulares que se diferenciam em sua estrutura, química e função (Bear, Connors, Paradiso, 2008).

A existência de sinalização bidirecional entre astrócitos e neurônios, revelou um papel importante e ativo dos astrócitos na fisiologia do sistema nervoso. Assim, um novo tipo de sinapse é descrito, a sinapse tripartite, onde os astrócitos trocam informações com elementos pré e pós-sinápticos, participando como elementos reguladores dinâmicos na neurotransmissão, sendo considerados como o terceiro elemento da sinapse (Perea, Araque, 2005). A figura 3 representa a sinapse tripartite.

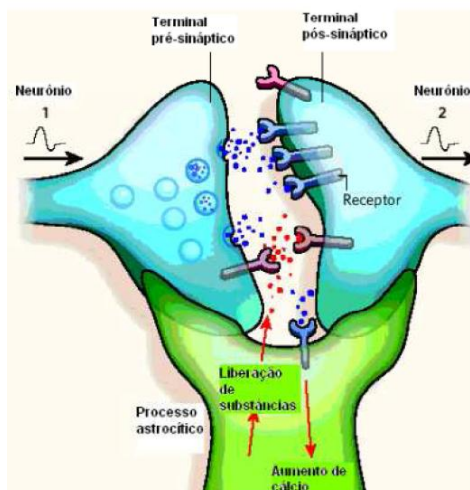


Figura 3. A sinapse tripartite. Fonte: Allen & Barres, 2009

Os astrócitos possuem um alto grau de plasticidade, cabendo-lhes inúmeras funções:

- Modulação da plasticidade e direcionamento sináptico durante o desenvolvimento;
- Produção de proteínas da matriz extracelular e de moléculas de adesão no SNC;

- Modulação da transmissão sináptica, exercendo papel no processamento de informações no cérebro;
 - Influenciam na formação e manutenção da barreira hematoencefálica;
 - Podem atuar como suporte energético neuronal, pelo estoque de glicogênio, que pode ser degradado fornecendo lactato aos neurônios;
 - Tamponam níveis de íons, como K^+ e Na^+ e lactato, preservando a atividade neuronal;
 - Participam da remoção de neurotransmissores na sinapse, como GABA e glutamato;
 - Podem sintetizar e liberar glutatona;
 - Participam da resposta imune-encefálica;
- (Revisão Jessen, 2004).

1.6 Proteína glial fibrilar ácida

A proteína fibrilar glial ácida (GFAP, do inglês *glial fibrilar acidic protein*) é uma proteína de filamentos intermediários do tipo III do citoesqueleto glial (Rodnight et al, 1997), com peso molecular aparente de 50kDA. Em sua estrutura, observam-se três regiões distintas: uma cabeça amino-terminal (básica), uma cauda carboxi-terminal (responsável pela ligação entre os monômeros) e uma porção central composta por uma extensa α -hélice, cuja sequência de aminoácidos é conservada em relação a outros tipos de proteínas componentes dos filamentos intermediários (Eng et al, 2000).

A GFAP é um marcador específico de astrócitos, sendo um dos principais antígenos utilizados para a identificação e estudo do comportamento astrocítico. Mudanças no conteúdo da GFAP são observadas quando há uma ativação glial em

resposta à injúria. Apresentando-se aumentada no tecido, pode ser interpretado como um sinal de astrogliose associada a condições de dano cerebral (Eng et al, 2000).

1.7 Proteína S100B

A família de proteínas ligantes de cálcio S100 é denominada assim, pois seus representantes são solúveis em 100% de sulfato de amônio (Donato, 2001). A proteína S100B é uma das representantes dessa família, sendo uma proteína do tipo EF-hand (hélice-loop-hélice), com peso molecular de 21 kDa e dois sítios de ligação ao cálcio por monômeros (Donato, 2003).

Esta proteína é produzida e secretada principalmente por astrócitos, possuindo ações tanto intra quanto extracelulares, sobre neurônios e sobre outros astrócitos (Rothermundt Peters et al. 2003). Tais efeitos são mediados, em parte, pela interação da S100B como receptor para produtos finais de glicação avançados (RAGE), um receptor multiligante, envolvido na transdução de estímulos inflamatórios e de diversos fatores neurotróficos e neurotóxicos (Donato 2001 e 2003). No desenvolvimento do cérebro e na sequência de ativação glial aguda em resposta à lesão, a proteína S100B atua como um fator neurotrófico e de sobrevivência neuronal. Em contraste, a superprodução de S100B por ativação glial pode levar à exacerbação da neuroinflamação e disfunção neuronal. Esta dualidade de ações da S100B, tanto reparadoras quanto degenerativas, é consistente com evidências clínicas da associação entre o aumento dos níveis de S100B e o resultado de lesão cerebral (Van Eldik e Wainwrigth, 2003).

1.8 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs)

A família das MAPKs é composta por proteínas serino-treonina cinases, ativas por fosforilação e mediadoras de várias respostas celulares, como proliferação celular, diferenciação, sobrevivência e morte (Kim & Choi, 2010). As três principais MAPKs identificadas são as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2), cinase c-Jun e N-terminal (JNK 1/2) e as p38^{MAPK} (Chang & Karin, 2001; Chen et al, 2001). Todas as vias operam em forma de cascata: uma MAP cinase cinase cinase (MAP3K) ativa, por fosforilação, uma MAP cinase cinase (MAP2K) que, por sua vez, fosforila e ativa a MAP cinase (MAPK).

Um estudo avaliou BaP em associação ao cádmio, visto que estes 2 compostos estão amplamente distribuídos no ambiente e também por ambos estarem presentes no cigarro. Na cultura celular de células HL-60 (células leucêmicas pró-mielocíticas), o metabólito do BaP, o BPDE, como esperado, induziu apoptose (mecanismo que pode ser considerado como uma medida de proteção celular para eliminar a possibilidade de fixação de danos ao DNA que podem levar a mutação). O cádmio, em concentrações baixas, interferiu na indução de apoptose em células danificadas pelo BPDE, sendo considerado como um reforço sinérgico da transformação celular induzida por HPAs. Contrária à função habitual apoptótica de cádmio, a função antiapoptótica foi atribuída a um aumento da ERK, podendo representar um possível mecanismo de atividade co-carcinógeno de cádmio na presença de HPAs (Mukherjee, et al. 2009).

Lin e colaboradores (2008), estudaram possíveis vias de sinalização associadas à resposta ao BaP. Utilizando cultura de células epiteliais Hep-G2, estes observaram que o tratamento com BaP aumentou os níveis da proteína p53, ativou o MAPK p38 e ERK, mas não alterou a JNK. Neste estudo, os autores sugerem que o

BaP induz a ativação da p53 por uma via dependente da ativação das MAPK p38 e ERK, podendo envolver danos ao DNA (Lin, et al. 2008). A Figura 4 representa um modelo esquemático da sinalização induzida por BaP.

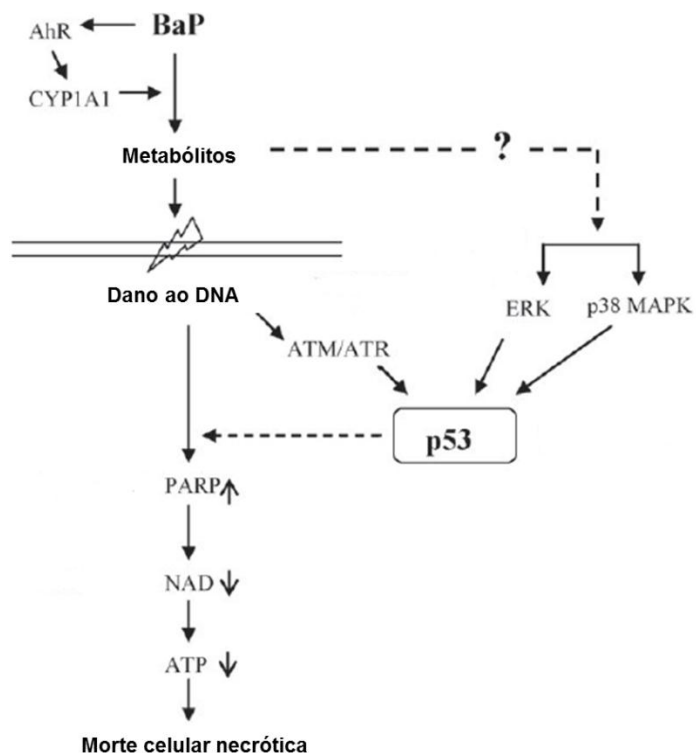


Figura 4. Modelo esquemático do caminho de sinalização induzido por BaP que conduz a ativação da p53 e morte celular (Fonte Lin, Mak e Yang, 2008).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade induzida por doses de BaP comumente presente como contaminante de águas e alimentos.

Objetivos específicos

Esta dissertação será apresentada na forma de capítulos, que visam atingir os seguintes objetivos:

Capítulos I e II

- Avaliar os efeitos neurotóxicos induzidos pela administração subcrônica oral em ratos Wistar de BaP (1 mg/kg em fêmeas e 2 mg/kg em machos) sobre:

- Atividade locomotora;
- Memória através do Teste de Reconhecimento de Objetos;

- Avaliar dano ao DNA através do ensaio cometa.

Capítulo III

- Avaliar os efeitos neurotóxicos induzidos pela administração subcrônica oral de BaP (2 mg/kg) em ratos Wistar machos sobre:

- parâmetros comportamentais (Atividade Locomotora e Memória de Reconhecimento);
- marcadores astrogliais (S100B e GFAP) em hipocampo, líquido e soro;
- fosforilação de proteínas MAPKs hipocampais (p38, ERK 1/2 e JNK 1/2).

PARTE II

Capítulo I

**AVALIAÇÃO DE EFEITOS COMPORTAMENTAIS E DANO AO DNA INDUZIDOS
POR BENZO[a]PIRENO EM RATAS APÓS ADMINISTRAÇÃO SUBCRÔNICA**

**Manuscrito a ser submetido à
*Revista Brasileira de Toxicologia***

Avaliação de efeitos comportamentais e dano ao DNA induzidos por Benzo[a]pireno em ratas após administração subcrônica

Evaluation of behavioral effects and DNA damage induced by benzo[a]pyrene in female rats after subchronical treatment

Érica Santos Maciel¹, Rebeca Vargas Antunes Schunck¹, Gabriela Curbeti Becker⁴, Janaína Solomon⁴, Cátia dos Santos Branco², Eliane Dallegrave, Natália Brucker³, Mirian Salvador², Solange Cristina Garcia³, Mirna Bainy Leal^{1,4*}

1. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Neurociências, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

2. Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS

3. Laboratório de Toxicologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

4. Departamento de Farmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

* Autor correspondente:

Profa Dra Mirna Bainy Leal

Departamento de Farmacologia / ICBS - UFRGS

Sarmento Leite 500 sala 202

90050-170 - Porto Alegre - RS

Fone/fax: 51-3308-3121

e-mail: mirnabl@gmail.com

RESUMO

Benzo[a]pireno (BaP) é um composto carcinogênico e mutagênico pertencente à classe de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Apesar de seus efeitos tóxicos serem amplamente estudados, os mecanismos por meio dos quais pode causar danos ainda permanecem incertos. No presente estudo, investigamos os efeitos da administração subcrônica oral de BaP em ratas. Animais receberam diariamente (30 dias), BaP na dose de 1 mg/kg ou veículo via gavagem. Foram realizados testes de avaliação da atividade locomotora, tarefa de memória (longa duração) de reconhecimento de objetos e a análise do dano ao ácido dessoxiribonucléico através do ensaio cometa. Um aumento da atividade locomotora foi observado ($p < 0,05$) nos animais tratados com BaP no decorrer do tratamento (dia 14) e uma tendência ($p = 0,07$) ao final dos tratamentos (dia 28). No teste de reconhecimento de objetos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. O dano ao DNA foi significativamente maior nos animais tratados com BaP ($p < 0,05$) quando comparados aos controles. O BaP foi capaz de induzir dano ao DNA e alterar a atividade locomotora de animais mesmo em uma concentração baixa, próxima a encontrada em alimentos. Assim, faz-se necessário uma legislação mais eficiente para este composto, visto que pode acarretar sérios problemas a saúde.

UNITERMOS: Benzo[a]pireno, atividade locomotora, memória de reconhecimento de objetos, dano ao DNA e ensaio cometa

ABSTRACT

Benzo[a]pyrene (BaP) is a carcinogenic and mutagenic compound belonging to the class of polycyclic aromatic hydrocarbons. Besides its toxicological effects are very well studied, the mechanisms by it can cause damages remains unknown. In this work we investigated the effects of BaP oral subchronical administration in female rats. Animals (n=6-8/per group) received daily (for 30 days) BaP 1 mg/kg or vehicle per oral gavage. Locomotory activity, object recognition memory test and evaluation of DNA damage through the comet assay was evaluated. Increase in locomotor activity was observed ($p < 0.05$) in animals treated with BaP in the course of treatment (day 14) and a trend ($p = 0.07$) at the end of treatment (day 28). In the recognition test objects were not observed significant statistical differences between groups. The DNA damage was significantly greater in animals treated with BaP ($p < 0.05$) when compared to controls. BaP was capable of inducing DNA damage and alterations the locomotor activity of animals even at low concentration, close to that found in foods. Thus, it is necessary legislation more efficient for this compound, since it can cause serious health problems.

KEYWORDS: Benzo[a]pyrene, locomotory activity, object recognition memory, DNA damage and comet assay.

1. INTRODUÇÃO

Benzo[a]pireno (BaP) é um composto tóxico pertencente à classe de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), conhecido por ser um poderoso agente mutagênico e carcinogênico (1-2), formado pela combustão incompleta de matérias orgânicas tais como carvão, madeira, petróleo e gasolina e como resultado da queima de lixo (3). Indústrias promovem a emissão de altas concentrações de HPAs para o meio ambiente durante seus processos, os quais irão se acumular no ar, no solo e na água como material particulado (3). A exposição humana ao BaP pode ocorrer pela ingestão de água e alimentos contaminados (4) ou pela inalação de poluentes (3). Outro fator que também aumenta substancialmente a exposição humana ao BaP é a fumaça de cigarro (3).

Sobre a contaminação por BaP na água e alimentos, países como a Alemanha, Áustria e Polônia possuem limites estabelecidos de BaP apenas para um número restrito de alimentos, usando como limite referencial para avaliar a contaminação de outros alimentos o teor máximo de BaP de 1 µg/Kg, encontrado em carnes defumadas (5). Para óleos e gorduras, as indústrias alemãs recomendam seus próprios limites: a soma dos resíduos dos HPAs leves não deve exceder a 25 µg/Kg, enquanto que a soma dos HPAs pesados, que inclui o BaP, deve permanecer abaixo de 5 µg/Kg (6).

De acordo com decisão do Comitê Científico da Alimentação Humana, da Comunidade Européia (CE), os níveis de HPAs e de BaP nos gêneros alimentícios devem ser reduzidos a concentrações tão baixas quanto possível. Dessa forma, através do Regulamento (CE) nº 208, de 04 de fevereiro de 2005, este Comitê determinou que se utilizasse o BaP como marcador relativo à ocorrência de outros HPAs cancerígenos e determinou limites máximos para este contaminante para

alguns tipos de alimentos como 5 µg/Kg de BaP para carnes defumadas e produtos defumados a base de carne, para moluscos bivalves 10 µg/Kg, entre outros (7).

O Brasil carece de normas mais eficientes para o controle do teor deste composto nos alimentos, pois a legislação vigente estabelece limite máximo de BaP apenas para água de consumo (0,7 µg/L) (8) e aroma de fumaça (0,03 µg/kg de produto final) (9).

Por possuir acentuada característica lipofílica (10), estudos observaram que o BaP atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e, assim, distribuir-se no encéfalo (11-12). Sendo assim, o sistema nervoso central pode ser extremamente afetado por danos causados pelo BaP (17).

Estudos avaliando a neurotoxicidade em animais tratados com BaP mostraram alterações comportamentais tais como fraqueza neuromuscular quando administrado agudamente via oral (13-14). Redução no potencial de longa duração (LTP) do hipocampo foram encontrados quando animais foram expostos à inalação do BaP (15-16). BaP também aumentou parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo de ratos tratados agudamente com este composto (17).

Estudos recentes avaliaram o impacto da administração oral de BaP em ratos nos processos de aprendizado e memória espacial, através do teste comportamental do labirinto aquático de Morris. Nestes estudos, o tratamento com BaP prejudicou o desempenho dos animais no teste, resultado que pode estar relacionado com déficits nos processos de aprendizagem e memória. Além desta constatação, o tratamento com BaP causou alterações no sistema de neurotransmissores hipocampal (18) e sérios danos nos neurônios do hipocampo, entre os quais podemos citar: mitocôndrias inchadas e distorcidas com formação de vacúolos,

rompimento do aparelho de Golgi, colapso no nucléolo e degeneração da bainha de mielina (19).

Apesar dos diversos estudos avaliando os efeitos deletérios do BaP, ainda existem lacunas em relação aos mecanismos responsáveis pelos efeitos tóxicos induzidos pelo composto. Como as pesquisas existentes geralmente abordam administrações agudas e com doses elevadas, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito tóxico da administração subcrônica oral de uma dose baixa de BaP em ratas Wistar, aproximando-se assim de valores de BaP presentes nos alimentos. Pelo fato da concentração de BaP escolhida para este estudo ser menor do que a usualmente encontrada na literatura, e devido ao comprovado efeito de BaP em induzir mutagenicidade, carcinogênese e genotoxicidade, o potencial de causar dano ao DNA em dose baixa foi avaliado através do ensaio cometa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar adultas (120 dias) pesando entre 250 a 300 g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animal de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL-UFRGS). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, (parecer número 18287). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm) (5 ratos por caixa) com livre acesso a água e alimento, em ciclos de claro/escuro de 12 horas (7 – 19h), e ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade monitorada.

Por se tratar de fêmeas, antes de cada experimento comportamental o ciclo estral foi avaliado através de esfregaços vaginais. Somente quando os animais se encontravam nas fases metaestro ou diestro é que seu perfil comportamental foi

avaliado. A variação nos dias de realização dos testes comportamentais foi de ± 1 dia, levando-se em consideração o resultado desses esfregaços.

2.2. Substâncias e Tratamentos

Benzo[a]pireno (99% de pureza) foi obtido da Sigma (Sigma - Aldrich C., St. Louis, MO, USA) e dissolvido em óleo de amendoim. O BaP foi administrado na dose de 1 mg/kg, que corresponde a níveis de contaminação em fumantes, consumidores de alta quantidade de produtos defumados ou de carnes e peixes grelhados, ou ainda, indivíduos com alta exposição ocupacional (20).

Os animais foram divididos em dois grupos (n = 6-8 / grupo), sendo um grupo tratado com BaP na dose de 1 mg/kg e o outro grupo recebeu somente o veículo de dissolução do BaP (óleo de amendoim). Os animais foram tratados diariamente, via gavagem, por 30 dias consecutivos e os sinais de morbidade, toxicidade e mortalidade foram avaliados em todos os dias. No final do estudo os ratos foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (50 mg/kg) por via intraperitoneal e o sangue da veia cava caudal foi coletado em tubo contendo heparina. Posteriormente, as ratas foram eutanasiadas por perfuração do diafragma e seus órgãos removidos e limpos de tecidos adjacentes.

2.3. Peso Relativo

Os animais foram pesados diariamente e o peso relativo dos animais foi obtido a partir da seguinte equação: $\text{Peso Relativo} = (\text{Peso do animal} \times 100) / \text{Peso do animal no } 1^{\circ} \text{ dia}$. Este mesmo cálculo foi realizado para os órgãos (fígado, rins, pulmões, coração, baço, adrenais e cérebro total), porém, calculado em relação ao peso total dos animais no último dia de tratamento.

2.4. Atividade Locomotora

A atividade locomotora dos animais foi avaliada no decorrer do tratamento (dia 14 e 28). O teste foi adaptado de Creese e colaboradores (21). Os animais foram colocados individualmente na caixa de atividade locomotora (*Insight Equipamentos Ltda.*) (50 x 48 x 50 cm), dotada de seis barras, cada uma com 16 sensores de luz infravermelha que detectam a posição relativa do animal na caixa. A distância total percorrida pelo animal foi registrada durante 15 minutos, sendo os 5 minutos iniciais considerados atividade exploratória e os 10 minutos finais a atividade locomotora. O teste foi realizado em uma sala escura e sem barulho.

2.5. Reconhecimento de Objetos (RO)

Foi realizado na caixa de atividade locomotora, apresentando como única diferença o fato do chão da caixa ser totalmente recoberto com maravalha. A avaliação locomotora do dia 28 foi utilizada como habituação para o teste de RO. Posterior à habituação, os animais foram treinados (dia 29) e, após 24 horas do treino, as ratas foram avaliadas para o teste de RO (dia 30). Baseado no teste descrito por Dias e colaboradores (22), as ratas foram individualmente colocadas na caixa contendo 2 objetos exatamente iguais (A e A'), sendo-lhes permitido explorá-los livremente até totalizar 30 segundos (cronometrados) de exploração dos objetos. Após, os animais foram imediatamente retirados da caixa ("sessão treino"). O teste de retenção foi realizado para avaliar a memória de longa duração (24 h após treino). Nestas sessões de teste de 5 min. de duração, as ratas foram individualmente re-introduzidas na caixa de atividade locomotora onde um dos objetos apresentados durante o treino foi aleatoriamente substituído por um objeto novo (A e B). O tempo gasto pelo animal na exploração de cada objeto foi cronometrado por mais de um observador e expresso como porcentagem do tempo

total de exploração. Calculou-se, então, o Índice de Reconhecimento (IR) = TB / (TA + TB), onde TA = tempo gasto explorando o objeto familiar e TB = tempo gasto explorando o objeto novo.

2.6. Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi adaptado do protocolo padrão de preparação e análise de Collins e colaboradores (23) e foi conduzido sob baixa e indireta condição de luz incandescente (60 W), a fim de minimizar os danos induzidos pela luz ao DNA das células. Os slides foram preparados pela mistura de 5 μ L de sangue total com 95 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,75%). A mistura foi vertida sobre uma lâmina de microscópio fosca revestida com agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Após solidificação, a lâmina foi removida e os slides foram colocados em uma solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA e 10 mM de tampão tris, pH 10-10,5, com adição de 1 mL de Triton X-100 e 10% DMSO), por um período mínimo de 1 hora e máximo de 5 dias. Subsequentemente, os slides foram incubados em tampão alcalino (300 mM de NaOH e 1 mM de EDTA, pH 12,6) por 10 min. A eletroforese de DNA foi de 20 min, a 25 V (0,9 V/cm) em 300 mA em tampão Tris 0,4 M (pH=7,5). Após, o DNA foi corado com nitrato de prata, e as lâminas foram codificadas para análise cega. Foram usados controles internos negativos e positivos para confirmação da eficiência da eletroforese. Imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 de cada slide preparado) foram analisadas a partir de cada amostra. Cada corrida de eletroforese só foi considerada válida se os controles positivos e negativos rendessem os resultados esperados. Os danos foram visualmente pontuados de acordo com o tamanho da cauda de DNA em cinco graus: nenhuma cauda (0) e comprimento máximo de cauda (4) resultantes de danos ao

DNA. Assim, o índice de dano (ID) poderia variar de 0 (todas as células sem cauda, 100 células X 0) para 400 (todas as células com caudas extremamente longas, 100 células X 4).

2.7. Análise estatística

O peso relativo corporal e dos órgãos foram analisados por ANOVA de uma via de medidas repetidas.

Nos testes comportamentais, a análise da atividade locomotora foi avaliada através do Teste *t* Pareado de Student e para o teste de memória, a comparação entre os grupos do índice de reconhecimento obtido foi através de Mann-Whitney *U* teste.

Os resultados tanto do índice de dano ao DNA quanto das diferentes classes de dano, foram analisados através do teste *t* de Student.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação de toxicidade e pesos relativos

Durante as observações realizadas diariamente ao longo do tratamento, não foram observados sinais de morbidade, toxicidade ou mortalidade (dados não mostrados). Pesos corporais relativos são mostrados na figura 1. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no peso relativo. Os pesos relativos dos órgãos também não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (dados não mostrados).

3.2. Atividade Locomotora

O resultado da distância total percorrida pelos animais está mostrado na figura 2. Os dados representam a média ± erro padrão da média da distância

percorrida nos 10 minutos de teste, sendo consideradas medidas de atividade locomotora. No dia 14, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$, teste t de Student) na média de atividade locomotora dos animais tratados com BaP 1 mg/kg ($1051,67 \pm 117,18$ cm) em comparação ao grupo controle ($676,24 \pm 106,59$ cm). No dia 28, ambos os grupos diminuíram sua atividade locomotora, porém, os animais tratados com BaP 1 mg/kg apresentaram uma tendência de aumento na atividade locomotora ($p = 0,07$; teste t de Student).

3.3. Reconhecimento de Objetos

A figura 3 mostra o efeito da administração de BaP sobre a memória de reconhecimento nos animais. Os animais na sessão treino obtiveram os seguintes índices de reconhecimento, expressos em mediana [intervalo interquartil]: 48,0 [40,0 / 62,0] para o grupo controle e 46,0 [35,3 / 71,2] para o grupo BaP 1mg/kg, não apresentando assim, diferença significativa entre os grupos. Não houve também diferença estatisticamente significativa na retenção da memória (LTP) entre os grupos, pois os índices de reconhecimento obtidos para os animais do grupo controle e BaP 1mg/kg foram 42,3 [37,6 / 56,0] e 45,3 [26,4 / 63,3], respectivamente.

3.4. Ensaio Cometa

A figura 4 apresenta os índices totais de dano ao DNA obtidos no sangue dos animais tratados com BaP ou veículo (óleo de amendoim). Um efeito genotóxico foi observado nos animais tratados com BaP. O índice de dano total ao DNA nos animais tratados com BaP 1mg/kg ($122,83 \pm 32,56$) foi maior em relação ao grupo controle ($38,17 \pm 7,17$), ($p < 0,05$, teste t , Student).

Na tabela 1 são mostradas as frequências de danos de cada classe. Grau 0 significa nenhum dano, graus 2 e 3 intermediários e grau 4 grave. O grupo controle

apresentou uma maior frequência de células intactas, ou seja, não apresentavam danos (grau 0) e não apresentou danos do tipo 4, enquanto BaP 1mg/kg induziu a formação de danos graves ao DNA.

4. DISCUSSÃO

Tendo em vista que os mecanismos por meio dos quais BaP induz toxicidade ainda permanecem pouco esclarecidos, este trabalho avaliou o efeito da administração subcrônica de BaP (1 mg/kg) a ratas Wistar. Nos parâmetros comportamentais avaliados, de acordo com os nossos resultados, os animais tratados com BaP apresentaram um aumento na atividade locomotora e não apresentaram déficits na memória de longa duração em relação ao grupo controle. No ensaio cometa, BaP provocou danos graves ao DNA não observados no grupo controle.

Em relação ao peso relativo, não houve diferença estatisticamente significativa no ganho de massa corporal e no peso relativo dos órgãos ao longo do período de tratamento. Assim, podemos considerar que as alterações manifestadas sobre o dano ao DNA e na alteração comportamental, são efeitos diretos da substância e não indiretos de uma toxicidade sistêmica.

No teste de avaliação da atividade locomotora, o aumento observado na distância total percorrida pelo grupo tratado com BaP em relação ao grupo controle é oposto ao encontrado na literatura, onde BaP diminuiu a atividade locomotora dos animais (13-14). Entretanto, as doses utilizadas nestes estudos, em geral, são extremamente altas ($\geq 25\text{mg/kg}$) e administradas agudamente. Nestes estudos, concomitante a avaliação da atividade locomotora foi realizada a dosagem dos metabólitos intermediário de BaP. Com isso, os autores observaram que a

diminuição da atividade locomotora foi dose e tempo dependente, ou seja, quanto maior a dose, maior a quantidade de metabólitos de BaP nos tecidos cerebrais (córtex e cerebelo, regiões envolvidas no controle da locomoção), menor a atividade locomotora e maior o tempo para esta alteração voltar aos valores do grupo controle, sugerindo, assim, que os efeitos neurotóxicos do BaP são produzidos pelos seus metabólitos (14). No último dia de avaliação, a diminuição observada em ambos os grupos pode refletir uma adaptação dos animais ao aparato utilizado no teste. Em nosso estudo, tanto a dose (1 mg/kg) quanto o tempo de administração (30 dias) difere dos encontrados na literatura. Nossos resultados sugerem que outro mecanismo pode estar envolvido na toxicidade do BaP em doses baixas e por períodos mais prolongados, diferente do mecanismo em tratamentos agudos e em doses altas. Outros estudos devem ser realizados para elucidar que mecanismo é este envolvido na toxicidade deste composto em administrações em longo prazo.

Além disso, parece haver uma ligação estreita entre modificações nos níveis de neurotransmissores no hipocampo e as diferenças de desempenho comportamental em animais tratados com BaP (Xia et al., 2011), visto que a redução da atividade locomotora também pode ser explicada pela estimulação adrenérgica produzida por BaP, em doses elevadas, devido à administração de agonistas β_2 -adrenoceptores e doses elevadas de agonistas α_1 -adrenoceptores produzirem o mesmo efeito (24).

Com relação ao teste de reconhecimento de objetos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Este resultado pode estar relacionado, em parte, à curta duração do tratamento (30 dias) e à baixa concentração (1 mg/kg) de BaP utilizada, em relação a estudos com tratamentos prolongados (90 dias) e doses maiores (2 mg/kg) que obtiveram resultados significativos em testes comportamentais, inclusive de memória (18-19). Este teste envolve uma memória

correspondente à memória declarativa em humanos, e no nosso estudo, a memória de curta duração não foi avaliada.

Nossos resultados demonstraram que BaP foi capaz de induzir danos ao DNA mesmo em uma dose baixa, até mesmo dano de grau 4, o mais grave. A toxicidade do BaP é atribuída a sua potente ação pró-carcinogênica, uma vez que alguns dos seus metabólitos intermediários são intercalantes de DNA e, portanto, agentes mutagênicos/oncogênicos e pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que também são responsáveis pelo aumento da cisão de DNA (25).

Em geral, compostos pertencentes a HPA, grupo no qual o BaP é o representante principal, são catalizados pela monooxigenase CYP P450 para formar produtos tóxicos dihidrodiois (4,5; 7,8; 9,10-diois) e produtos não tóxicos hidroxilados (3- e 9[OH] BaP) (26,27). Dentre os produtos mais deletérios destaca-se o B(a)P-7,8-diol o qual pode ser transformado em metabólitos, tal como 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), ou pode ser ativado a catecol através da enzima aldo-ceto-redutase. Como o catecol é instável, prontamente ocorre auto-oxidação a o-quinona, que pode reagir com GSH, RNA e DNA e/ou propiciar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Produção de EROs leva, então, a um aumento na cisão do DNA e a um aumento na formação de 8-oxo-dGuo, o qual se acredita ser responsável pela transformação do nucleotídeo G a T na cadeia de DNA, mutação que pode levar à carcinogenicidade (27-28).

O BaP pode causar danos ao DNA como conseqüência da geração de EROs e da ineficiente proteção oferecida pelo sistema antioxidante enzimático ao estresse oxidativo causado pelas EROs, tal como foi demonstrado após tratamento agudo com BaP em camundongos (29). Além disso, genes também são afetados pelo efeito deletério de BaP, pois, após a administração sub-aguda de BaP, através de

injeção intraperitoneal em camundongos, foi observado alteração na modulação da expressão do gene da subunidade NR1, responsável por um dos subtipos de receptor de glutamato *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA). Danos neste gene estão associados a prejuízos na função de aprendizagem e memória e também a comprometimento do potencial de longa duração (LTP) (30).

Com isso, associa-se que o dano induzido pelo BaP esteja ligado à geração de EROs e ao estresse oxidativo causado como consequência da proteção ineficaz oferecida pelo sistema antioxidante endógeno (17). Por sua característica lipofílica, o BaP pode facilmente atravessar a barreira hematoencefálica e distribuir-se no sistema nervoso, aumentando sua suscetibilidade a substâncias tóxicas (5). Além disso, danos encefálicos causados por compostos oxidantes podem ser mais acentuados devido ao cérebro ter uma alta taxa de consumo de oxigênio, um alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática e um deficiente sistema de defesa antioxidante (22). O estresse oxidativo provocado pelo BaP contribui significativamente para os danos causados ao DNA, sendo um dos principais mecanismos responsáveis pelos efeitos tóxicos do BaP.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os nossos resultados, BaP foi capaz de causar danos graves ao DNA no sangue e aumentar a atividade locomotora em ratas mesmo em concentração baixa, próxima a encontrada nos alimentos. Mais estudos são necessários para avaliar os efeitos tóxicos induzidos por BaP, entretanto, com estes resultados, observamos que faz-se necessário uma legislação mais eficiente para este composto, visto que tanto a água como os alimentos estão expostos na

natureza à contaminação por esta substância, podendo acarretar sérios problemas a saúde humana.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Nacional de Análise Integrada do Risco Ambiental (INCT) Coordenado pelo Prof Dr Paulo Hilário Nascimento Saldiva (USP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à PROPESQ/UFRGS pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Yang Y et al. Ring opening of benzo(a)pyrene in the germ-free rat is a novel pathway for formation of potentially genotoxic metabolites. *Biochemistry* 2000; 39:15585–15591.
- (2) Annas A, Brittebo E, Hellman B. Evaluation of benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human endothelial cells using alkaline single cell gel electrophoresis. *Mutat Res* 2000; 471:145–155.
- (3) ATSDR. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Atlanta: ATSDR, 1995.
- (4) Phillips, DH. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res* 1999; 443: 139–147.
- (5) Simko, P. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoking flavoring food additives. *Journal of Chromatography* 2002 B, 770
- (6) Camargo MCR, Toledo MCF. Avaliação da contaminação de diferentes grupos de alimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Braz J Food Technol* 2002; 5:19-26.

- (7) CEC. Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) nº 208/2005 of 4 February 2005a amending Regulation (EC) nº 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons. Official Journal L 034:3-5.
- (8) BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
- (9) BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 02, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
- (10) Ramesh A, Inyang F, Hood DB, Archibong AE, Knuckles ME, Nyanda AM. Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(a)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Exp Toxicol Pathol* 2001; 53:275–290.
- (11) Das M, Mukhtar H, Seth P. Distribution of benzo(a)pyrene in discrete regions of rat brain. *Bull Environ Contam Toxicol* 1985; 35:500–504.
- (12) Yan T, Chengzhi C, Haiyan Y, Baijie T. Distribution of benzo[a]pyrene in discrete regions of rat brain tissue using light microscopic autoradiography and gamma counting. *Toxicol Environ Chem* 2010; 92:1309-1317.
- (13) Saunders CR, Shockley DC, Knuckles ME. Depression of locomotor activity in rats after acute exposure to benzo(a)pyrene acute in F-344 rats. *Neurotox Res* 2001; 3:557–579.
- (14) Saunders CR, Ramesh A, Shockley DC. Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo(a)pyrene. *Toxicol Lett* 2002; 129:33–45.
- (15) Wormley DD et al. Inhaled benzo(a)pyrene impairs long-term potentiation in the F1 generation rat dentate gyrus. *Cell Mol Biol* 2004a; 50:715-721.
- (16) Wormley DD, Ramesh A, Hood DB. Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity and behavior. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004b; 197:49-65.

- (17) Saunders CR, Das SK, Ramesh A, Shockley DC, Mukherjee S. Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *J Appl Toxicol* 2006; 26:427–438.
- (18) Xia Y et al. Effects of subchronic exposure to benzo(a)pyrene (B[a]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague–Dawley rat. *Neurotoxicology* 2011; 32:188–198.
- (19) Chengzi C et al. New candidate proteins for Benzo(a)pyrene-induced spatial learning and memory deficits. *J Toxicol Sci* 2011; 36:163-171.
- (20) ATSDR 1995. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
- (21) Creese I, Burt DR, Snyder SH. Dopamine-receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 1976; 192:481-483.
- (22) Dias P et al. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience* 2007; 146:1719–1725.
- (23) Collins AR et al. The comet assay: topic issues. *Mutagenesis* 2008; 23:143–51.
- (24) Stone EA, Quartermain D, Lin Y, Lehmann ML. Central α 1-adrenergic system in behavioral activity and depression. *Biochem. Pharmacol* 2007; 73, 1063–1075
- (25) Wattenberg LW, Leong JL. Inhibition of the carcinogenic action of benzo(a)pyrene by flavones. *Cancer Research* 1970; 30:1922–1925
- (26) Calabrese V, Bates TE, Stella AMG. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res* 2000; 25:1315–1341.
- (27) Baird WM, Ralston SL. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. In Bowden GT, Fischer SM. (editor) *Comprehensive Toxicology, Chemical Carcinogens and Anticarcinogens*. Amsterdam: Elsevier Press 1997; 12:171–200.
- (28) Palackal NT, Burczynski ME, Harvey RG, Penning TM. The ubiquitous aldehyde reductase (AKR1A1) oxidizes proximate carcinogen trans-dihydrodiols to o-quinones:

potential role in polycyclic aromatic hydrocarbon activation. *Biochemistry* 2001; 40:10901–10910.

(29) Gao M et al. Induction of oxidative stress and DNA damage in cervix in acute treatment with benzo(a)pyrene. *Mut Res* 2011; 719:52–59.

(30) Grova N, Valley A, Turner JD, Morel A, Muller CP, Schroeder H. Modulation of behavior and NMDA-R1 gene mRNA expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a)pyrene. *NeuroToxicology* 2007; 28:630–636.

Legenda das Figuras

Figura 1. Peso relativo de ratas tratadas via gavagem com benzo[a]pireno 1mg/kg (BaP) ou veículo (óleo de amendoim) por 30 dias. Valores representam média \pm erro padrão (n = 6-8, ANOVA de uma via de medidas repetidas, $p < 0,05$).

Figura 2. Distância percorrida por ratas tratadas via gavagem com benzo[a]pireno 1 mg/kg (BaP) ou veículo (óleo de amendoim) por 30 dias. Cada coluna representa média \pm erro padrão da média da distância percorrida pelos animais nos 10 minutos de teste (n = 6-8). * $p < 0,05$ BaP vs Controle, teste *t* Student. Tendência no dia 28 ($p = 0,07$, teste *t* de Student).

Figura 3. Avaliação da memória de reconhecimento de objetos de ratas tratadas via gavagem com benzo[a]pireno 1 mg/kg (BaP) ou veículo (óleo de amendoim) por 30 dias. Memória de longa duração (LTP) foi avaliada 24h após a sessão de treino. Índice de reconhecimento obtido através da equação $(IR) = TB / (TA + TB)$, onde TB = tempo gasto explorando o objeto familiar e TA = tempo gasto explorando o objeto novo. Valores representam mediana [intervalo interquartil] (n = 6-8, Mann-Whitney *U* teste, $p < 0,05$).

Figura 4: Valores médios do índice de dano ao DNA (Ensaio Cometa) em amostras de sangue de ratas tratadas via gavagem com Benzo[a]pireno 1 mg/kg (BaP) ou veículo (óleo de amendoim) por 30 dias. Valores representam média \pm desvio padrão da média (n = 6-8), * teste *t* de Student com $p < 0,01$.

Figuras

Figura 1

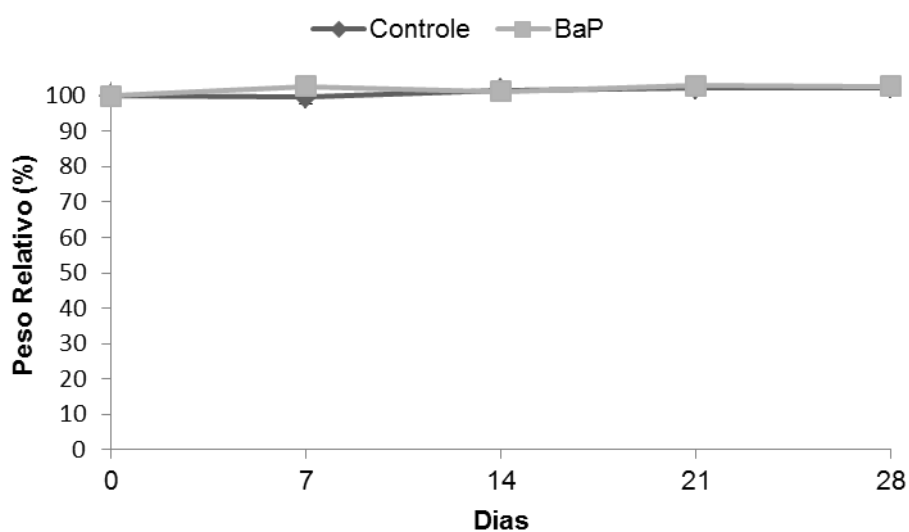


Figura 2

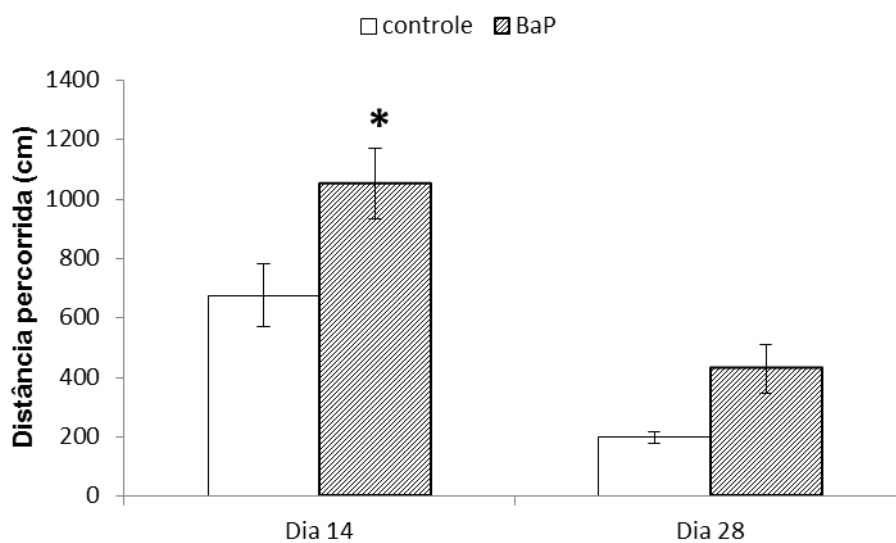


Figura 3

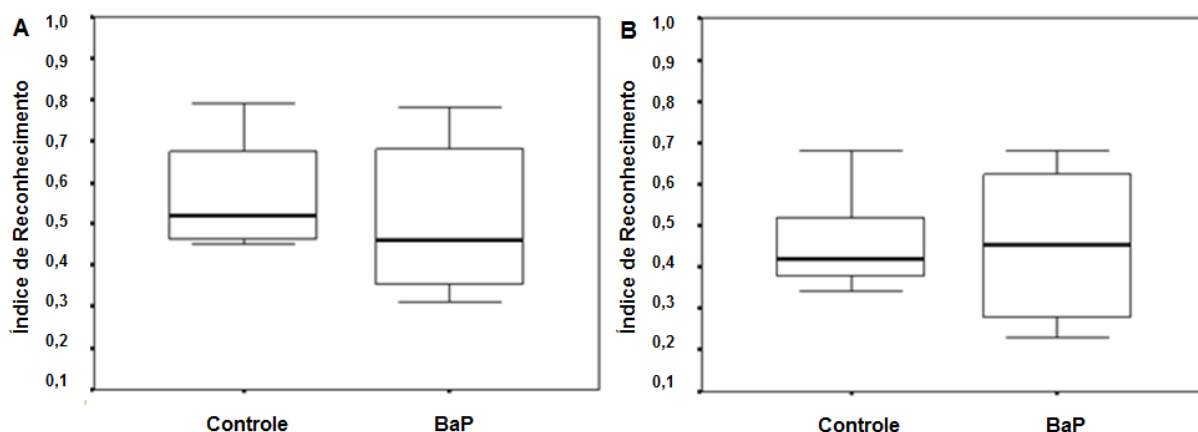


Figura 4

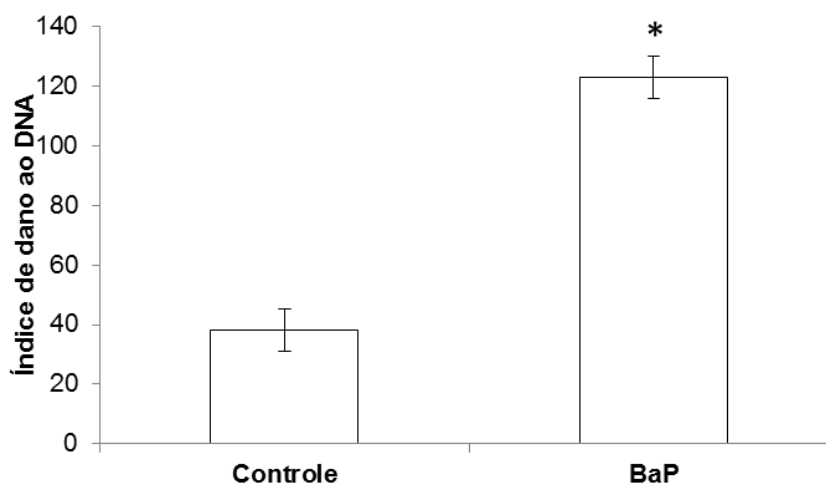


Tabela 1. Frequência de dano ao DNA avaliado pelo ensaio cometa.

	Classes de Dano ao DNA				
	0	1	2	3	4
Controle	71,17 ± 6,31	20,67 ± 7,55	6,00 ± 2,37	2,83 ± 1,33	0,00 ± 0,00
BaP	29,67 ± 12,04*	33,67 ± 10,73*	26,50 ± 19,38*	5,13 ± 3,85	5,67 ± 2,16*

As amostras de sangue total foram obtidas de ratas tratadas por 30 dias com benzo[a]pireno 1 mg/kg (BaP) ou com veículo (óleo de amendoim). Valores representam média ± desvio padrão da média. * p<0,05, teste t de Student.

Capítulo II

**BEHAVIORAL ALTERATIONS AND INDUCTION OF DNA DAMAGE AFTER
SUBCHRONIC ORAL ADMINISTRATION OF BENZO[a]PYRENE**

Manuscrito a ser submetido ao periódico

Food and Chemical Toxicology

Behavioral alterations and induction of DNA damage after subchronic oral administration of Benzo[a]pyrene

Érica Santos Maciel^a, Gabriela Curbeti Becker^b, Rebeca Vargas Antunes Schunck^a, Cátia dos Santos Branco^c, Fernando Araújo de Souza^d, Rachel Picada Bulcão^d, Eliane Dallegrave^e, Mirian Salvador^c, Solange Cristina Garcia^d, Mirna Bainy Leal^{a,b}.

^aPrograma de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bLaboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^cLaboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

^dLaboratório de Toxicologia, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^eDepartamento de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), RS, Brazil and Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS), Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author:

Profa Dra Mirna Bainy Leal

Departamento de Farmacologia / ICBS - UFRGS

Sarmiento Leite 500 sala 202

90050-170 - Porto Alegre - RS

Fone/fax: 51-3308-3121

e-mail: mirnabl@gmail.com

Abstract

Benzo[a]pyrene (BaP) is a compound ubiquitous in the environment and is released as a result of incomplete combustion or pyrolysis of organic material. Due to the presence of BaP in food and water, the objective of this study was to investigate the effects of subchronic oral administration of BaP on behavioral parameters and induction of damage to deoxyribonucleic acid (DNA) in male Wistar rats. Animals (6-8 per group) were treated with BaP (2 mg/kg) or corn oil (control group), via gavage, once a day for 28 days. Test evaluation of locomotor activity and object recognition memory (short and long term) were used to analyze behavioral changes after administration. Blood samples from the caudal vena cava were collected for analysis of DNA damage (comet assay). We observed a significant increase in locomotor activity of animals BaP-treated compared to control group ($p < 0.05$). Results obtained for object recognition test, evaluating short-term memory, showing a trend deficit in the short-term memory ($p = 0.064$). A genotoxic effect was found in animals BaP-treated ($p = 0.001$). Class three ($p < 0.001$) and four ($p < 0.01$) DNA damage in BaP-treated group were higher than control group, which showed a higher frequency of cells without damage ($p < 0.01$). Oxidative stress induced by BaP associated with the formation of ultimate carcinogenic metabolites reported in the literature are probably the mechanisms that resulted in damage to DNA observed in our study and might also have contributed to the observed behavioral changes, being a major contributor to the toxic effects of BaP.

Keywords: Benzo[a]pyrene, locomotor activity, object recognition memory, DNA damage, comet assay.

1. Introduction

The Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) family is formed by chemical compounds ubiquitous in the environment that are released as a result of incomplete combustion or pyrolysis of organic material, such as coal, oil, wood and fuels, like diesel oil and petrol, and also is present in tobacco smoke. Automobile exhaust has been recognized as the major PAH contributor in urban areas (Velasco et al. 2004). These substances are found as a contaminant of air, water, soils and sediments (ATSDR, 1995). Benzo[a]pyrene (BaP) is the most representative compound of PAHs and it is a powerful mutagenic and carcinogenic agent which has been shown to induce gene mutations, chromosomal aberrations and other types of genotoxic effects in a number of experimental systems (IARC, 2012).

BaP is considered a complete carcinogen, ie, produces the initiation and promotion of carcinogenesis (Halliwell and Gutteridge, 1989). Animal studies indicated that BaP exposure can cause immunotoxicity and tumor formation in multiple organs. Thus, BaP at high doses has been used as a model of tumor formation and inducing gastric (Agha et al., 2001; Goyal et al., 2010), lung (Kamaraj et al., 2009; Paul et al., 2011; Ravichandran et al., 2011) and skin (Shimizu et al., 2000) carcinogenesis.

BaP exerts its primarily effects on liver, kidneys, reproductive and immune systems. However, BaP can readily cross the blood brain barrier and reach on many brain regions. Thus, the central nervous system (CNS) may be extremely affected by damage caused by BaP (Das et al., 1985; Yan et al., 2010). Behavioral changes are usually the first indications of exposure to a neurotoxicant.

Animal studies using different doses and routes of administration, showed that BaP was capable of causing behavioral and neurochemical changes: such as

impaired learning and memory (through Morris water maze test) (Xia et al., 2011; Chengzi et al., 2011), decreased motor activity, neuromuscular, physiological and autonomic abnormalities, and decreased responsiveness to sensory stimuli (Saunders et al., 2001; 2002; 2006). BaP also has changed the neurotransmitter system of hippocampus (Xia et al., 2011), severe damage to hippocampal neurons (Chengzi et al., 2011) and was able to cross transplacental barrier of pregnant dams altering fetal survival and pregnancy-related hormones (Hood et al., 2000; Archibong et al., 2002).

The human exposure of BaP occurs through ingestion of contaminated food and water or inhalation of ambient air particles (ATSDR, 1995). Only a few countries such as Germany, Austria and Poland, have some type of regulation for its presence on water and for a limited number of food, such as smoked meat or some types of fish (Simko, 2002). Previous studies suggest that BaP may be implicated in human diseases, including cancer, cardiovascular, pulmonary, and neurodegenerative diseases, infertility and growth retardation in children (Enomoto et al., 2008).

Therefore, the focus of this study was to evaluate the impact of subchronic administration of BaP by gavage, in a dose typically found in water and foods, on neurotoxicity and genotoxicity, evaluated through behavioral parameters and comet assay, respectively.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Males Wistar rats, adults (120 days) weighing 250-300g, from the Center for Reproduction and Animal Experimentation Laboratory of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS-CREAL) were used. The experiments were performed

after approval of the protocol by the University Research Ethics Committee (number 18287) and were carried out in accordance with current guidelines for the care of laboratory animals (Olfert et al. 1998). The animals were kept in polypropylene cages (41 x 34 x 16 cm) (5 rats per cage) with free access to food and water, under standard conditions of temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), controlled humidity and 12h light/dark cycle.

2.2 Chemicals

BaP (99% purity) and Methyl methanesulfonate (M4016) were obtained from Sigma (Sigma - C Aldrich, St. Louis, MO, USA) and dissolved in corn oil. Low melting point agarose (0.75%) was obtained of Pronadise and Normal melting point agarose (1.5%) was obtained of Agargen. The NaCl, NaOH, EDTA, Tris, Triton X - 100, DMSO all from E. Merck.

2.3 Subchronic administration and signs of toxicity

The experimental protocol was based on OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development, 1995) guideline 407 (Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents). The experiment was conducted distributing the rodents into groups of 6-8 male rats each. Animals were treated by gavage for 28 consecutive days with vehicle (oil corn) or BaP 2 mg/kg. Signs of toxicity, morbidity and mortality were observed daily. At the end of the experiment, animals were anesthetized (xylazine 10 mg/kg and ketamine 100 mg/kg), the blood from the caudal cava vena was collected into tubes containing heparin for DNA damage analysis and after, animals were euthanized (by diaphragma perforation) and necropsied.

2.4 Relative weight

Body weight was measured every day. Selected organs (heart, liver, lung, brain, spleen, kidneys and adrenal glands) were collected and observed for macroscopic alterations. The calculation of the relative weight was obtained using the following equation: $\text{Relative weight} = (\text{weight of the animal} \times 100) / \text{weight of the animal on day 1}$. This same calculation was made for the organs (liver, kidneys, lungs, heart, spleen, adrenal glands and brain) however, the organ weight was divided by the weight of the animal on the last day of treatment.

2.5 Measurement of spontaneous locomotor activity

The method for the spontaneous locomotor activity was adapted from Creese et al. (1976). The animals were placed individually in locomotor activity cages (Insight Equipment Ltd.), (50 x 48 x 50 cm) equipped with six bars, with 16 infrared light sensors each that detect the relative position of the animal. The total distance traveled by the animal was evaluated for 15 minutes, the initial 5 minutes was considered exploratory activity and the final 10 minutes the test session. The activity was held in a dark and without noise room.

We performed two sessions of locomotor activity: the first one was before starting the treatments, in order to evaluate the baseline locomotor activity of animals, without treatment interference. The second session was after 26 days of treatment, to observe the effect of BaP itself.

2.6 Novel object recognition memory

Twenty-four hours after locomotor activity measurement, animals were trained and tested in a novel object recognition task as previously described (Schröder et al., 2003; de Lima et al., 2005). Training in the object recognition task took place in the same cages used for the locomotor activity, which were used as a context habituation trial for the recognition memory task. The object recognition test required that the rats recall of two plastic objects which they had been previously familiarized with. Twenty-four hours after arena exploration, training was conducted by placing individual rats into the cages, in which two identical objects (objects A1 and A2; Duplo Lego toys) were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. Animals were left to explore the objects for 5 min. In a short-term memory (STM) test given 1.5 h after training, the rats explored the cages locomotor activity for 5 min in the presence of one familiar (A) and one new (B) object. All objects presented similar textures, colors, and sizes, but distinctive shapes. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio $TN / (TF+TN)$ [TF = time spent exploring the familiar object A; TN = time spent exploring the new object B. After each trial objects were washed with 10% ethanol solution. In a long-term memory (LTM) test given 24 h after training, the same rats explored the cages for 5 min in the presence of a familiar object A and a new object C. Recognition memory was evaluated as STM test. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Sitting on the object was not considered exploration.

2.7 Genotoxicity assays

Single cell gel electrophoresis or comet assay was performed to assess potential genotoxic effects in the exposed group. The comet assay method was

adapted from Collins et al. (2008) and was conducted under low indirect incandescent light situations (60 W) in order to minimize light-induced damage to DNA cells. Blood samples were transported to the laboratory under refrigeration (10 to 20°C) and processed immediately. A standard protocol was adopted for comet assay preparation and analysis. Slides were prepared by mixing 5 µL whole blood and 95 µL low melting point agarose (0.75%). The mixture was poured onto a frosted microscope slide coated with normal melting point agarose (1.5%). After solidification, the coverslip was removed and the slides were placed in lysis solution [2.5 M NaCl, 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 10 mM Tris, pH = 10.0–10.5, with freshly added 1 ml Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide] for a minimum period of 1h and a maximum of 5 days. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH = 12.6, both from E. Merck) for 10 min. The DNA was electrophoresed for 20 min at 25 V (0.9 V/cm) 300 mA, and the buffer was neutralized with 0.4 M Tris (pH = 7.5). Finally, DNA was stained with silver nitrate, and the slides were coded for blind analysis. The electrophoresis procedures and the efficiency for each electrophoresis run were checked using negative and positive internal controls consisting of whole human blood collected in the laboratory: the negative internal control being whole blood and the positive internal control whole blood mixed with methyl methanesulfonate (M4016) to 8×10^{-5} M final concentration. This mixture was incubated at 37°C for 2 h. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicated slides) were analyzed from each sample. Each electrophoresis run was considered valid only if the negative and positive controls yielded the expected results. The damages were visually scored according to tail size into five classes, from no tail (0) to maximal (4) long tail, resulting in a single DNA damage score for

each subject and, consequently, for each study group. Therefore, a group damage index (DI) could range from 0 (all cells with no tail, 100 cells \times 0) to 400 (all cells with maximally long tails, 100 cells \times 4).

2.8 Statistical analysis

The relative body weight was analyzed by one-way repeated measures ANOVA. Comparisons between groups in novel object recognition memory test were performed using Mann-Whitney U test. The results of locomotor activity and genotoxicity assay (comet) were analyzed by Student's t -test.

3. Results

3.1 Relative weight

Figure 1 shows relative body weights (mean \pm standard error of the 0,7,14, 21 and 28 days). There was no statistical difference between groups. The relative weights of organs (liver, kidneys, lungs, heart, spleen, adrenal glands and brain) also did not show statistical differences between groups (data not shown).

3.2 Spontaneous locomotor activity

BaP effects on total distance are presented in Figure 2. Figure 2A represents the basal locomotor activity, performed before starting treatment. Figure 2B represents the average of total distance after 26 days of treatment, which was considered the measure of locomotor activity itself.

In Figure 2A, no differences were observed in baselines locomotor activity for all rats, both control or treated groups, before starting treatment (considered basal locomotor activity).

However, as can be seen in figure 2B, BaP-treated group (2 mg/kg) presented increased total distance (768.225 ± 112.356 cm) in comparison to control group (293.571 ± 147.637 cm) after 26 days of treatment ($p < 0.05$).

3.3 Novel object recognition memory

Figure 3 shows the effect of BaP on object recognition memory. There was no significant difference between groups in the training trial (median [interquartile ranges]) recognition indices were 56.1 [42.2 / 65.3] for control group and 47.7 [40.6 / 53.8] for group treated with BaP ($p = 0.64$).

In the STM retention trial (median [interquartile ranges]) recognition indices were 51.4 [43.6 / 59.9] for control group (corn oil-treated) and 38.6 [21.0 / 48.0] for group treated with BaP. Comparison of STM recognition indices has indicated a tendency of deficit in STM in group treated with BaP ($p = 0.065$) in comparison to control group.

There was no significant difference between groups in LTM retention trial (median [interquartile ranges]) recognition indices were 42.9 [39.0 / 56.0] in the control group and 42.3 [32.0 / 47.0] in the group treated with BaP ($p = 0.410$).

3.4 Genotoxicity assays

The genotoxic effect (comet assay) was found in BaP-treated group comparing to control group ($p = 0.001$) (Figure 4). DNA damage grade 3 ($p < 0.001$) and 4 ($p < 0.01$) found in group treated with BaP were higher than those observed for control group, which showed a higher frequency of undamaged DNA (Table 1).

4. DISCUSSION

Although BaP was administrated in a dose of 2 mg/kg that corresponds to similar levels of contamination in smokers, heavy consumers of smoked or grilled meat and fish, or individuals with heavy occupation exposure (ATSDR, 1995), an important point that should be taken into consideration is that the levels of BaP found in the environment are reflective of accumulations over a long period of time (Saunders et al., 2006) whereas the doses used in laboratory are acute, subchronic (30 days) or chronic (90 days). Thus, the actual effect of BaP on organisms may be more intense.

It has been reported that rodents when placed in a new environment tend to explore the site. Therefore, it was observed that all animals, for both groups, did not differ between themselves in the beginning of treatment. After locomotor activity, we observed an increase in total distance traveled by animals treated with BaP 2 mg/kg. One explanation for this increase may be obtained from the study by Xia et al (2011). They observed that the administration of BaP increased levels of endogenous monoamine (epinephrine and norepinephrine) in rat hippocampus. The increase in the interaction of monoamines which act on the adrenergic receptors may be responsible for the observed increase in activity (Stone et al., 2007). To confirm this hypothesis, the dosage of endogenous monoamines after administration of BaP can be performed in areas directly connected to the motor control, such as cerebellum and motor cortex.

On the other hand, our results differ to those found in the literature, where BaP-treated animals showed a decrease in the distance traveled after single dose treatment (Saunders et al., 2002 and 2006). Previous studies reported a reduction in glutamatergic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit (NR2B), in offspring of

rats treated with BaP at low-level doses (McCallister et al., 2008; Brown et al., 2007). This result explains, in part, the decrease in locomotor activity; however, the reduction in NMDA receptor subunit was found when *in utero* exposure occurs when synapses are first formed. Moreover, Saunders and co-workers used higher doses of BaP (25–200 mg/kg) in their studies. Locomotor activity reduction can also be explained by the adrenergic stimulation produced by BaP in high doses, due to the administration of β_2 -adrenoceptor agonists and high doses of α_1 -adrenoceptor agonists produce the same effect (Consoli et al., 2007; Stone et al., 2007). Furthermore, a significant correlation between neurotoxic effects, BaP, and brain metabolite concentrations was also observed in these studies, suggesting that metabolism plays an important role in modulating the neurobehavioral effects of BaP. Moreover, the recovery coincided with decreased concentration of BaP metabolites. More studies are needed to elucidate which mechanism might be involved in the toxicity of this compound after administrations of lower doses (found in foods) and for longer periods. The difference between our finding and those previous studies could be explained by the dose used and the treatment time.

In the object recognition test, we observed that animals treated with BaP showed a tendency of deficits in short-term memory, performed 1.5h after the training session. However, this deficit was not observed in long-term memory, performed 24h after the training session. This behavioral test is considered a non-aversive task to the animals, so, the longest time between training and the test long-term memory deteriorates the performance of novel object recognition of the animals. Thus, the best results with this test are generally found between sixty to ninety minutes after training (Sik et al., 2003). The deficit of object recognition memory is, in part, in agreement with other studies that showed deficits in another type of memory, the

spacial memory, of the Morris water maze test (Xia et al., 2011, Chengzi et al., 2011) after administration of BaP. This tendency would probably be confirmed by increasing the period of treatment or increase the number of animals per group.

In rodents, hippocampus is a structure of nervous system critical for learning and memory. Studies suggest that BaP may be responsible for lesions in the hippocampus of animals affecting the learning and memory (Grova et al., 2007; Wormley et al., 2004). In a study using a transmission electron microscopy were found neuronal ultrastructural alterations such as vacuole formation, from swollen and distorted mitochondria, endoplasmic reticulum expansion, Golgi apparatus disruption, nucleolus collapse or fragmentation and myelin sheath degeneration in hippocampal neurons of the animals treated with BaP, at the same dose used in our study (2 mg/kg) (Chengzi et al., 2011).

Regarding the body relative weight, there were no statistically significant differences in body mass gain of the animals throughout the treatment period, we consider that observed changes are direct effects of the substance and not an indirect systemic toxicity.

Furthermore, a genotoxic effect was observed in animals treated with BAP. Severe damage to DNA, grade 3 and 4, were significantly greater in animals treated with BaP compared to controls. This result is in agreement with other studies, where BaP also caused serious damage to DNA of cervical cells in mice (Gao et al., 2011). The difference in our study is that this genotoxicity was observed in a typically dose found in food or water.

There are three principal pathways currently proposed for metabolic activation of BaP: the pathway via bay region dihydrodiol epoxide by cytochrome P450 enzymes (CYPs), the pathway via radical cation by one-electron oxidation, and the

ortho-quinone pathway by dihydrodiol dehydrogenase. The first two pathways produce electrophiles that can covalently bind to DNA and cause cancer. The route of PAH-o-quinone, in addition to DNA adducts, reactive oxygen species (ROS) derived from the metabolism of BaP are formed and can produce oxidative stress, which contribute for DNA cleavage (Xue and Warshawsky, 2005).

In most cases, oxidation of PAHs by P450 enzymes is an initial step in the activation process to produce the polar biochemically reactive electrophilic species (ultimate carcinogenic metabolites) capable of interacting with cellular macromolecules, particularly nucleic acids and proteins. The reactive intermediates can bind to DNA, forming covalent adducts, which eventually cause carcinogenesis or other forms of toxicities. BaP-dihydrodiol, BaP-quinones and BaP- 7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE) are reactive intermediate resulting from the metabolism of BaP by cytochrome P450. BaP is catalyzed by cytochromes P450 enzymes, such as CYP1A1 and CYP1B1. Two studies demonstrated that CYP1A1 is the major enzyme responsible for the detoxification of orally ingested BaP, whereas CYP1B1 is the major enzyme responsible for BaP-induced chemical toxicity (Uno et al., 2004, 2006). Among these metabolites, BPDE is capable of binding covalently to DNA to form BPDE-DNA adducts (binds to the exocyclic nitrogen of deoxyguanosine or deoxyadenosine in DNA) (Chiapperino et al., 2005) considered as a crucial initial step in the sequence leading from the generation of mutations to uncontrolled cell growth and tumor formation (Flowers et al., 1996).

Several studies have classified BaP and its metabolites as potent oxidants. Selvendiran and Sakthisekaran showed that BaP interacts with membrane lipids and consequently induces free radical formation (Selvendiran and Sakthisekaran, 2004). The effects of BaP on antioxidant enzymes activity in brain superoxide dismutase

(SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and the levels of malondialdehyde (MDA), were considered as an index of oxidative tissue damage (Saunders, et al., 2006). Oxidative stress in the CNS through the generation of ROS and the repression of enzymatic antioxidants may be a critical mechanism of effects induced by BaP. The CNS is extremely susceptible to attack by ROS derived from BaP metabolism due to its high oxygen consumption, high iron, lipid content and low level of antioxidants. Oxidative stress can cause alterations in gene expression, impair cellular signaling, disrupt membrane integrity, alter neurotransmission and cause neuronal cell death (Lebel, 1991). Thus, oxidative stress may be one of the mechanisms responsible for behavioral changes observed in our study.

Therefore, oxidative stress induced by BaP associated with the formation of ultimate carcinogenic metabolites of BaP is probably the mechanism that resulted in damage to DNA. However, further studies are needed to clarify the mechanisms involved in behavioral changes observed in this study.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thanks to Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva for scientific support, to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the fellowship.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declared that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Agha, A.M., El-Fattah, A.A., Al-Zuhair, H.H., et al, 2001. Chemopreventive effect of *Ginkgo biloba* extract against benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice: amelioration of doxorubicin cardiotoxicity. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* 20, 39-50.
- Archibong, A.E., Inyang, F., Rameshm A., Greenwood, M., Nayyar, T., Kopsombut, P., et al., 2002. Alteration of pregnancy related hormones and fetal survival in F-344 rats by inhaled benzo(a)pyrene. *Reprod. Toxicol.* 16, 801–808.
- ATSDR, 1995. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
- Brown, L.A., Khoubouei, H., Goodwin, J.S., Irvin-Wilson, C.V., Ramesh, A., Sheng, L., McCallister, M.M., Jiang, G.C., Aschner, M. and Hood, D.B., 2007. Down-regulation of early ionotropic glutamate receptor subunit developmental expression as a mechanism for observed plasticity deficits following gestational exposure to benzo(a)pyrene. *Neurotoxicology* 28, 965-978.
- Chengzi, C., Yan, T., Shuqun, C., Xuejun, J., Youbin, Q., Yinyin, X., Quian, T., Baijie, T., 2011. New candidate proteins for Benzo(a)pyrene-induced spatial learning and memory deficits. *J. Toxicol. Sci.* 36, 163-171.
- Chiapperino, D., Cai, M., Sayer, J.M., Yagi, H., Kroth, H., Masutani, C., Hanaoka, F., Jerina, D.M., Cheh, A.M., 2005. Error-prone Translesion Synthesis by Human DNA Polymerase η on DNA-containing Deoxyadenosine Adducts of 7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *J. Biol. Chem.* 280, 39684-39692
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovanneli, L., Kruszewski, M., et al., 2008. The comet assay: topic issues. *Mutagenesis* 23(3),143–151.
- Consoli, D., Leggio, G.M., Mazzola, C., Micale, V., Drago, F., 2007. Behavioral effects of the b3 adrenoceptor agonist SR58611A: is it the putative prototype of a new class of antidepressant/anxiolytic drugs? *Eur. J. Pharmacol.* doi:10.1016/j.ejphar.2007.06.048.

Creese, I., Burt, D.R., Snyder, S.H., 1976. Dopamine-receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 192(4238), 481-483.

Das, M., Mukhtar, H., Seth, P., 1985. Distribution of benzo(a)pyrene in discrete regions of rat brain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 500–504.

de Lima, M.N.M., Laranja, D.C., Caldana, F., Bromberg, E., Roesler, R., Schröder, N., 2005. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp. Gerontol.* 40(6), 506–511.

Enomoto, M., Tierney, W.J., Nozaki, K., 2008. Risk of human health by particulate matter as a source of air pollution—comparison with tobacco smoking. *J. Toxicol. Sci.* 33, 251–67.

Flowers, L., Bleczinski, W.F., Burczynski, M.E., Harvey, R.G., Penning, T.M., 1996. Disposition and biological activity of benzo(a)pyrene-7,8-dione. A genotoxic metabolite generated by dihydrodiol dehydrogenase. *Biochemistry* 35, 13664–13672.

Gao, M., Li, Y., Long, J., Shah, W., Fu, L., Lai, B., Wang, Y., 2011. Induction of oxidative stress and DNA damage in cervix in acute treatment with benzo(a)pyrene. *Mut. Res.* 719, 52–59.

Goyal, P.K., Verma, P., Sharmam P., Parmar, J., Agarwal, A., 2010. Evaluation of Anti-Cancer and Anti-Oxidative Potential of *Syzygium Cumini* Against Benzo[a]pyrene (BaP) Induced Gastric Carcinogenesis in Mice. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 11, 753-758.

Grova, N., Valley, A., Turner, J.D., Morel, A., Muller, C.P., Schroeder, H., 2007. Modulation of behavior and NMDA-R1 gene mRNA expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a)pyrene. *Neurotoxicology* 28, 630-636.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*, second ed. New York Oxford University, Clarendon Press, USA, 466-495.

Hood, D.B., Nayyar, T., Ramesh, A., Greenwood, M., Inyang, F., 2000. Modulation in the developmental expression profile of Sp1 subsequent to transplacental exposure

of fetal rats to desorbed benzo-(a)pyrene following maternal inhalation. *Inhal. Toxicol.* 12, 511–535.

IARC, 2012. Benzo[a]pyrene. NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Chem. Man v: 92.*

Kamaraj, S., Ramakrishnan, G., Anandakumar, P., Jagan, S., Devaki, T., 2009. Antioxidant and anticancer efficacy of hesperidin in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice. *Invest. New Drugs* 27, 214–222.

Lebel C., 1991. Oxygen radicals: common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 341–346.

McCallister, M.M., Maguire, M., Ramesh, A., Aimin, Q., Liu, S., Khoshbouei, H., Aschner, M., Ebner, F.F., Hood, D.B., 2008. Prenatal exposure to benzo(a)pyrene impairs later-life cortical neuronal function. *NeuroToxicology* 29, 846–854.

Olfert, E.D., Cross, B.M., McWilliam, A., 1998. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Consejo Canadiense de Protección de Los Animales, v.1.

OECD, 1995. Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodent. <http://www.oecd.org/publications>. Paris: Head of Publications Service

Paul, S., Bhattacharyya, S.S., Samaddar, A., Boujedaini, N., Khuda-Bukhsh, A.R., 2011. Anticancer potentials of root extract *Polygala senega* against benzo[a]pyrene-induced lung cancer in mice. *J. Chin. Integr. Med.* 9(3), 320-327.

Ravichandran N, Suresh G, Ramesh B, Siva GV, 2011. Fisetin, a novel flavonol attenuates benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1141–1147.

Saunders, C.R., Shockley, D.C., Knuckles, M.E., 2001. Behavioral effects induced by acute exposure to benzo[a]pyrene in F-344 rats. *Neurotoxicol Res*; 3:557–79.

Saunders, C.R., Ramesh, A., Shockley, D.C., 2002. Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo(a)pyrene. *Toxicol. Lett.* 129, 33–45.

Saunders, C.R., Das, S.K., Ramesh, A., Shockley, D.C., Mukherjee, S., 2006. Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *J. Appl. Toxicol.* 26, 427–438.

Schmidt, J.V., Bradfield, C.A., 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12, 55-89.

Schröder, N., O'Dell, S.J., Marshall, J.F., 2003. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 49, 89–96.

Selvendiran, K., Sakthisekaran, D., 2004. Chemopreventive effect of piperine on modulating lipid peroxidation and membrane bound enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis. *Biomed. Pharmacother.* 58, 264–267.

Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Ishikawa, T., 2000. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(2), 779–782.

Sik, A., van Nieuwehuyzen, P., Prickaerts, J., and Blokland, A., 2003. Performance of different mouse strains in an object recognition task. *Behav. Brain Res.* 147, 49-54.

Simko, P., 2002; Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoking flavoring food additives. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 25, 770(1-2), 3-18.

Stone, E.A., Quartermain, D., Lin, Y., Lehmann, M.L., 2007. Central α 1-adrenergic system in behavioral activity and depression. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1063–1075

Uno, S., Dalton, T.P., Derkenne, S., Curran, C.P., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., 2004. Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol. Pharmacol.* 65, 1225–1237.

Uno, S., Dalton, T.P., Dragin, N., Curran, C.P., Derkenne, S., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Gonzalez, F.J., Nebert, D.W., 2006. Oral benzo[a]pyrene in Cyp1 knockout

mouse lines: CYP1A1 important in detoxication, CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate. *Mol. Pharmacol.* 69, 1103–1114.

Velasco, E., Siegmann, P., Siegmann, H.C., 2004. Exploratory study of particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in different environments of Mexico City. *Atmospheric Environment* 38, 4957–4968.

Xia, Y., Cheng, S., He, J., Liu, X., Tang, Y., Yuan, H., He, L., Lu, T., Tu, B., Wang, Y., 2011. Effects of subchronic exposure to benzo[a]pyrene (B[a]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague–Dawley rat. *NeuroToxicology* 32, 188–198.

Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 73–93.

Yan, T., Chengzhi, C., Haiyan, Y., Baijie, T., 2010. Distribution of benzo[a]pyrene in discrete regions of rat brain tissue using light microscopic autoradiography and gamma counting. *Toxicol. Environ. Chem.* 92, 1309-1317.

Wormley, D.D., Chirwa, S., Nayyer, T., Wu, J., Johnson, S., Brown, L.A., Harris, E., Hood, D.B., 2004. Inhaled benzo(a)pyrene impairs long-term potentiation in the F1 generation rat dentate gyrus. *Cell.Mol.Biol. (Noisy-le-grand)* 50(6), 715-721.

Legends to the figures

Fig. 1. Effects of BaP on relative weight. The BaP or the vehicle (corn oil) were administered orally (by gavage) once a day during 28 days. Each line represents the mean \pm SEM. ($n= 6-8$) evaluated by one-way repeated measures ANOVA.

Fig. 2. Effects of BaP on spontaneous locomotor activity. The BaP or the vehicle (corn oil) were administered orally (by gavage) once a day during 28 days. (A) Basal locomotory activity, were performed before starting treatment and (B) locomotor activity after 26 day treatment. Each column represents the mean \pm SEM. ($n= 6-8$). * $p < 0.05$ vs. vehicle - treated group. Student's *t*-test.

Fig. 3. Effect of BaP on recognition memory deficits. The BaP or the vehicle (corn oil) were administered orally (by gavage) once a day during 28 days. A. Training B. Short-term memory test (STM) was performed 1.5 h after training and C. long-term memory (LTM) at 24 h after training. The proportion of the total exploration time that the animal spent to investigate the new object was the “Recognition Index” expressed by the ratio $TN/TF+TN$, TF= time spent exploring the known object and TN= time spent exploring the new object. Data expressed as median [interquartiles ranges], (n = 6-7). Comparisons between groups - Mann-Whitney *U* test.

Fig. 4. Effect of BaP on DNA damage (Comet assay) in blood samples from rats. The BaP or vehicle (corn oil) were administered orally (by gavage) once a day during 28 days. Each column represents mean \pm standard deviation of mean of the index DNA damage. (n = 6 rats per group), * p = 0.001 vs. vehicle - treated group, Student's *t* test.

Figures

Figure 1

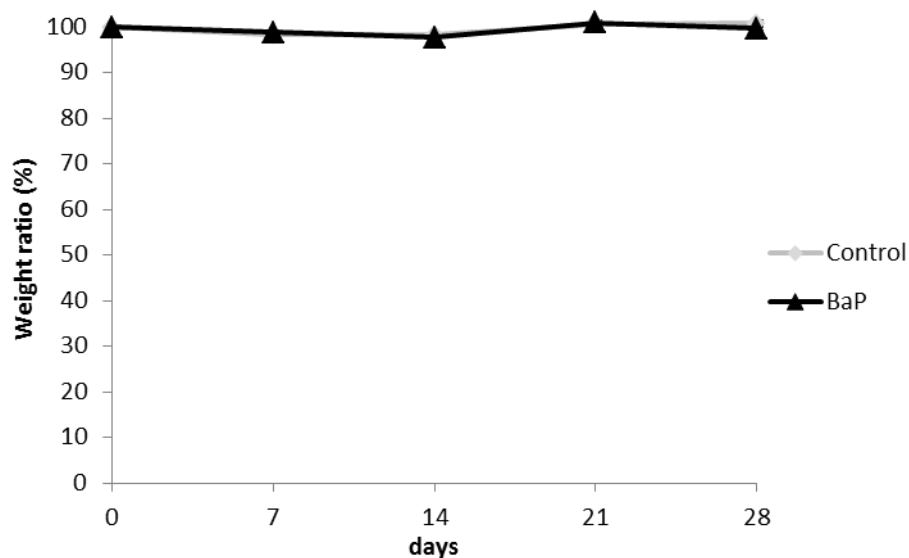


Figure 2

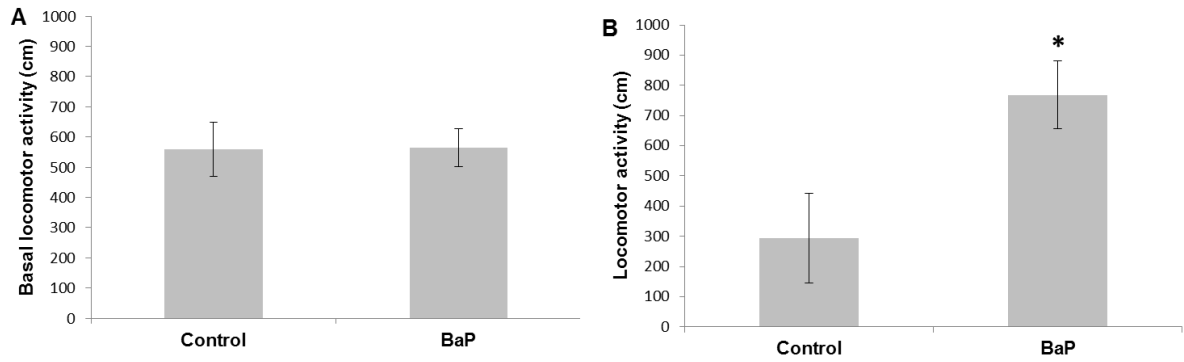


Figure 3

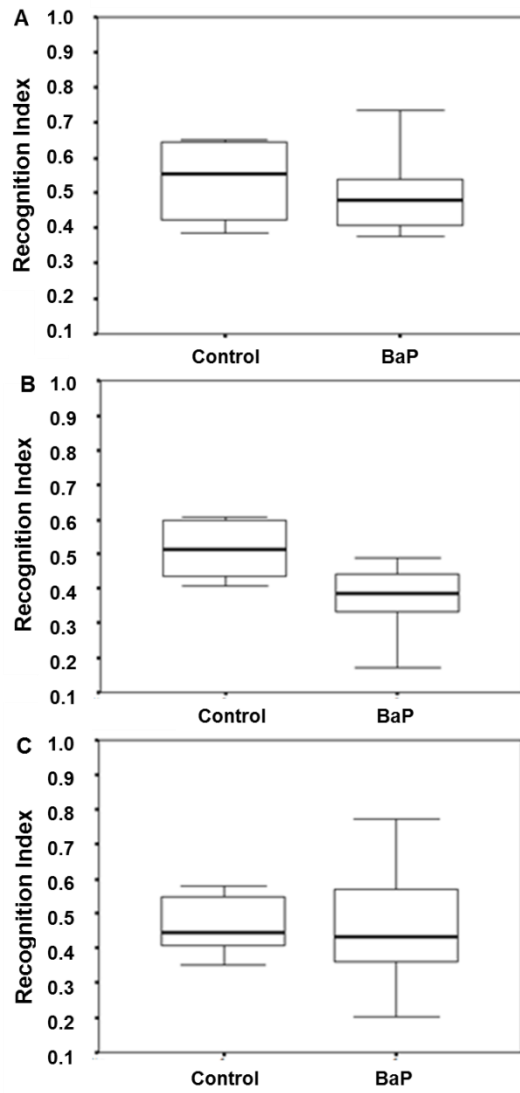


Figure 4

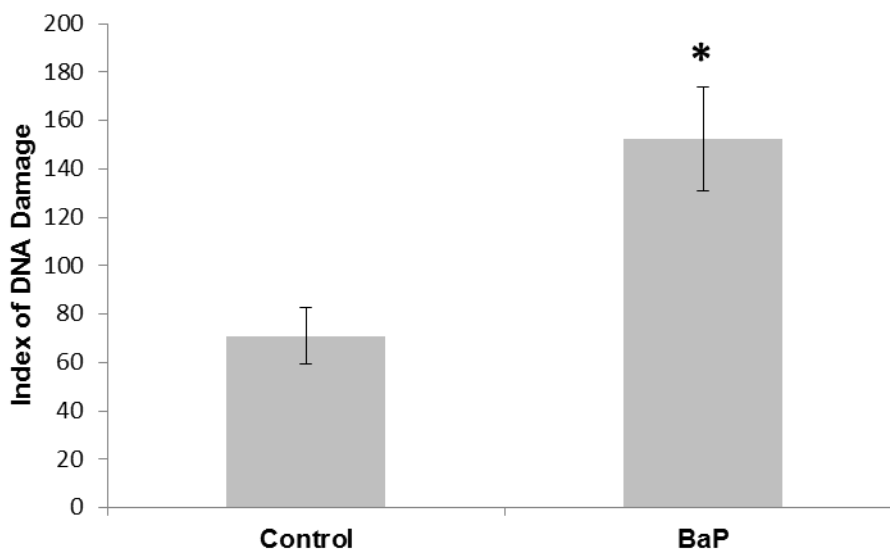


Table 1. Frequency of DNA damage evaluated by Comet Assay

Group	Grade of DNA Damage (%)				
	0	1	2	3	4
Control	50.33 ± 5.04	28.33 ± 6.76	17.33 ± 2.94	2.33 ± 0.80	1.67 ± 1.05
BaP	28.67 ± 2.28*	21.83 ± 2.40	25.67 ± 3.47	16.00 ± 1.88**	7.83 ± 1.97*

Blood samples from rats treated with BaP or vehicle (corn oil) were administered orally (by gavage) once a day during 28 days. Each line represents mean ± standard deviation of mean (n = 6 rats per group), Student's *t*-test inter-class. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

CAPITULO III

**BEHAVIORAL CHANGES AND NEUROCHEMICAL ALTERATIONS IN RATS
SUBMITTED TO SUBCHRONIC ORAL ADMINISTRATION OF BENZO[a]PYRENE.**

Manuscrito que será submetido ao periódico

Archives of Toxicology

Behavioral changes and neurochemical alterations in rats submitted to subchronic oral administration of benzo[a]pyrene

Érica Santos Maciel¹, Regina Biasibetti², Ana Paula Costa³, Paula Lunardi², Rebeca Vargas Antunes Schunck¹, Gabriela Curbeti Becker⁴, Eliane Dallegrave⁴, Carlos Alberto Gonçalves², Solange Cristina Garcia, Rodrigo Bainy Leal³, Mirna Bainy Leal^{1,5}.

¹Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

⁴Departamento de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre and Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author:

Profa Dra Mirna Bainy Leal

Departamento de Farmacologia / ICBS - UFRGS

Sarmento Leite 500 sala 202

90050-170 - Porto Alegre - RS

Fone/fax: 51-3308-3121

e-mail: mirnabl@gmail.com

Abstract

Benzo[a]pyrene (BaP) is an environmental contaminant produced during incomplete combustion of organic material that is well known as a mutagenic and carcinogenic toxicant. BaP may also cross the blood-brain barrier and target the central nervous system (CNS) causing neurotoxicity. However, there are few studies addressing the molecular, cellular and behavioral alterations consequents to BaP exposure. Toxic injuries toward CNS can activate astrocytic responses involving changes in the level of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100 β . Moreover, it is well characterized that cell signaling pathways, such as mitogen activated protein kinases (MAPKs), which regulate cell proliferation, survival and death, as well as neuroplasticity, are in many cases involved in the mechanism of neurotoxicity of environmental toxicants. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of subchronic oral administration of BaP on behavioral and neurochemical parameters. Wistar male rats (90 days, weight 250-300g) were treated with BaP (2 mg/kg) or corn oil (control) via gavage, once a day for 28 days (n=12/group). Thereafter, spontaneous locomotor activity and short- and long-term memory (through the test of object recognition) were evaluated. Neurochemical parameters such as GFAP and S100B content in the hippocampus, serum and CSF were measured through ELISA, while the total and phosphorylated forms of MAPKs (ERK1/2, p38^{MAPK} and JNK1/2) were evaluated in the hippocampus by western blotting. The results showed that BaP induces a significant ($p < 0.05$) increase on locomotor activity and a decrease in the short-term memory as compared to control group. The content of S100B was increased significantly ($p < 0.05$) in cerebrospinal fluid, but decreased ($p < 0.05$) in the serum of BaP-treated animals. GFAP trend ($p = 0.07$) in animals treated with BaP, suggesting a trend for astrogliosis. Regarding the modulation of MAPKs, BaP treatment induced a decrease ($p < 0.01$) on ERK2 phosphorylation in the hippocampus without any changes of p38^{MAPK} or JNK1/2 phosphorylation. Thus, BaP 2 mg/kg induces an astroglial response, impair, both motor and cognitive behavior, with parallel inhibition of ERK2, a signaling enzyme involved in the hippocampal neuroplasticity. All these effects suggest BaP neurotoxicity as concern for environmental pollution.

KEYWORDS: Benzo[a]pyrene, locomotor activity, object recognition, GFAP, S100B, MAPKs

Introduction

Benzo[a]pyrene (BaP) is a member of the group of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) which is a widespread environmental contaminant formed during incomplete combustion or pyrolysis of organic material. This substance is found as a contaminant of air, water, soils and sediments. Human exposure to significant amounts of BaP occurs through the ingestion of contaminated food and water or the inhalation of particulates in the air (ATSDR 1995). Automobile exhaust (especially from diesel engines), industrial emissions and forest fires are important sources of environmental BaP (Liu et al. 2002; IARC 2012). Additionally, tobacco smoke contains high concentrations of PAHs, especially BaP (IARC 2012).

Several studies suggest that BaP can cause damages to human health, including cancers, cardiovascular, pulmonary and neurodegenerative diseases and it has been implicated in infertility and growth retarded child (Enomoto et al. 2008).

The role of BaP as a potent mutagen and carcinogen agent is well defined (IARC 1973), however, only recently the neurotoxic effects of BaP have been receiving attention. As a highly lipophilic compound, BaP readily crosses the blood-brain barrier and reaches the central nervous system (CNS) causing neurological alterations (Das et al. 1985; Yan et al. 2010).

The ionotropic glutamate receptors alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors mediate excitatory synaptic transmission that are crucial for many physiological aspects of brain development and adult brain plasticity including learning, memory and cognition. Prenatal exposure to BaP results in diminished mRNA expression of the NMDA receptor subunit NR2B, resulting in late life deficits in cortical neuronal activity in the offspring (McCallister et al. 2008). Additionally, gestational exposure to

BaP induced a decrease in the post-natal expression of ionotropic glutamate receptor subunits NR2A and NR2B (of NMDA receptor) and GluR1 (of AMPA receptor), suggesting that synaptic plasticity and behavioral deficits observed as a result of gestational BaP exposure may be related with down-regulation of these glutamate receptor subunits (Brown et al. 2007).

Several studies demonstrate the pivotal role of the hippocampus to memory formation and learning (Zola-Morgan and Squire 1990; Lubenov and Siapas 2009). It was noted that sub-chronic administration of BaP in rats prejudices their performance in Morris water maze test and induces changes of hippocampal neurotransmitter systems (Xia et al. 2011) and damage of hippocampal neurons (Chengzi et al. 2011), reinforcing BaP as a neurotoxic pollutant that may act on the hippocampus and impair learning and memory.

Astrocytes are intimately associated with neurons and play an important role in brain homeostasis. Glial activation in response to injury stimuli commonly involves changes in glial fibrillary acid protein (GFAP), S100B protein and antioxidant defenses (Eng et al. 2000, Donato et al. 2009). GFAP is a specific astrocyte marker; currently, tissue GFAP increase is taken as a sign of astrogliosis, associated with conditions of brain injury (Eng et al. 2000).

The calcium binding protein S100B is found in brain tissue, predominantly in the astrocytes, which secrete this molecule. Extracellular S100B plays a trophic role in neuronal and glial cells, but elevated extracellular levels of this protein could induce apoptosis in neural cells (Van Eldik and Wainwright 2003). Cerebrospinal fluid and serum S100B levels have been used as markers of brain insult (Andreazza et al. 2007; Vicente et al. 2004).

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a family of serine-threonine kinases that amplify and integrate signals originating from a variety of extracellular stimuli and may regulate cell differentiation, survival, cell death and synaptic plasticity (Sweatt, 2004; Thomas and Huganir, 2004). The best known MAPKs include the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), c-Jun amino-terminal kinases 1 to 3 (JNK1/2/3) and p38^{MAPK} (α , β , γ and δ) (Cargnello and Roux, 2011). All these kinases become functional upon phosphorylation at both a threonine and a tyrosine residue by an upstream MAPK (Chen et al.2001; Thomas and Huganir, 2004). In the hippocampus activation of MAPK pathway may occur in response to glutamate, through activation of NMDA and AMPA receptors (Jerusalinsky et al.1992; Sweatt, 2001), oxidative stress (Runchel, 2011), growth factors and cytokines (Kim and Choi, 2010) or by activation of other protein kinases. MAPKs misregulation are associated, in many cases, with detrimental processes including dendritic spine loss, cell death and may impair learning and memory (Sanderson and Dell'Acqua, 2011). Therefore, alteration of ERK, JNK and p38^{MAPK} pathways by neurotoxicants may imply in important functional changes of CNS.

Despite numerous studies evaluating the possible mechanisms involved in the behavioral deficits associated with neurotoxicity induced by BaP, some parameters have not been fully elucidated. Therefore, the aim of this study was to evaluate the impact of oral administration of BaP in rat hippocampus on the glial marker GFAP and S100B protein, and on MAPKs signaling pathways. Extracellular S100B was also assessed at serum and CSF and behavioral assessments of locomotion and memory were taken in order to evidence BaP-dependent neurological impairment.

Materials and Methods

Chemicals

Benzo[a]pyrene (99% purity) was obtained from Sigma (Sigma - C Aldrich, St. Louis, MO, USA) and dissolved in corn oil. Anti-S100 and anti-GFAP antibodies were from Dako. Peroxidase-conjugated secondary antibody was from Amersham. Triton X-100, sodium dodecyl sulfate (SDS), acrylamide and bis-acrylamide were obtained from GE Healthcare Life Science. Glycine, Tris, TEMED, β mercaptoethanol were obtained from Amresco Life Science. Bovine serum albumin (BSA) was from Inlab. Primary antibodies anti-JNK1/2, anti-ERK1/2 and anti-p38^{MAPK}, Ammonium persulfate (APS), o-phenylenediamine (OPD) and anti-S100B monoclonal antibody were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Mouse anti- β actin was obtained from Santa Cruz Biotechnology. Immobilon nitrocellulose and goat anti-mouse IgG HRP (horseradish peroxidase) was from the Millipore. The anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-JNK1/2, anti-phospho-P38^{MAPK} antibodies and LumiGLO reagent (luminol chemiluminescent substrate) were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). All other reagents were of analytical grade.

Animals

Twenty-four male Wistar rats, adult (90 days) weighing 250-300g, from the Center for Reproduction and Animal Experimentation Laboratory of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS-CREAL) were used. The experiments were performed after approval of the protocol by the University Ethics Committee (number 18287) and were carried out in accordance with current guidelines for the care of laboratory animals (Olfert et al. 1998). The animals were kept in polypropylene cages (41 x 34 x 16 cm) (5 rats per cage) with free access to food and water, under

standard conditions (12h light/12h dark cycle, at a constant temperature of 22 ±2°C and controlled humidity).

Subchronic administration

The experimental protocol was based on OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) guideline 407 (Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents). Rats were divided into 2 groups: control (n=12) and BaP (n=12). Animals were treated by gavage for 28 consecutive days with corn oil (control) or BaP 2mg/kg. This dose is equivalent to contamination levels in smokers, consumers of high amounts of products as smoked or grilled meat and fish, or even individuals with high occupational exposure (ATSDR, 1995).

Relative body weight

Body weight was measured every day and the animals were observed daily for signs of toxicity, morbidity and mortality. The calculation of the relative weight was obtained daily with the body weight of the rats, using the following equation: Relative Weight = (weight of the animal X 100) / weight of the animal on day 1.

Measurement of spontaneous locomotor activity

The method used for evaluation of spontaneous locomotor activity was adapted from Creese et al. (1976). The animals were placed individually in locomotor activity cages (Insight Equipment Ltd.), (50 x 48 x 50 cm) equipped with six bars, each with 16 infrared light sensors that detect the relative position of the animal on the box. The total distance traveled by the animal was evaluated for 15 minutes (5 initial minutes considered exploratory activity and the 10 final minutes the test

session). The test was performed after 26 days of treatment and the activity was performed in a dark room with no noise.

Novel object recognition memory

Twenty-four hours after locomotor activity measurement, animals were trained and tested in a novel object recognition task as previously described (Schröder et al. 2003; de Lima et al. 2005a,b). Training in the object recognition task took place in the same cages used for the locomotor activity. These cages were thus used as a context habituation trial for the recognition memory task. The object recognition test required that the rats recall which of two plastic objects they had been previously familiarized with. Twenty-four hours after arena exploration, training was conducted by placing individual rats into the cages, in which two identical objects (objects A1 and A2; Duplo Lego toys) were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. Animals were left to explore the objects for 5 min. In a short-term memory (STM) test given 1.5 h after training, the rats explored the locomotor activity cages for 5 min in the presence of one familiar (A) and one novel (B) object. In a long-term memory (LTM) test given 24 h after training, the same rats explored the cages for 5 min in the presence of familiar object A and a novel object C. Recognition memory was evaluated as for the STM test. All objects presented similar textures, colors, and sizes, but distinctive shapes. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio $TN/(TF+TN)$ [TF = time spent exploring the familiar object A; TN = time spent exploring the novel object B. Between trials the objects were washed with 10% ethanol solution. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Sitting on the object was not considered exploration.

Cerebrospinal fluid and serum samples

At the end of the behavioural experiment, animals were anesthetized using ketamine/xylazine (10 mg/kg and 50 mg/kg, respectively) and then positioned in a stereotaxic holder for cerebrospinal fluid collection from the cisterna magna. The puncture was performed using an insulin syringe (27 gauge 9 1/200 length). Rats were then removed from the stereotaxic apparatus and placed in a flat place; whole blood from the caudal vena cava was collected. Serum was separated by centrifugation at 3000 x *g* for 5 min. CSF and serum samples were frozen (-20°C) until further analysis (Netto et al. 2006).

Hippocampal tissue samples

The animals were killed by piercing the diaphragm, brains were removed, and hippocampi were dissected out and placed in cold saline medium with the following composition: 120 mM NaCl; 2 mM KCl; 1 mM CaCl₂; 1 mM MgSO₄; 25 mM HEPES; 1 mM KH₂PO₄ and 10 mM glucose, adjusted to pH 7.4. Hippocampal samples were then homogenized in specific buffers for biochemical measurements, described as follows.

ELISA for S100B and GFAP

The S100B content in the CSF and serum was measured by ELISA (Leite et al. 2008). Briefly, 50 µL of sample plus 50 µL of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1). Polyclonal anti-S100B was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. A colorimetric reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from

0.025 to 2.5 ng/mL. ELISA for GFAP in the hippocampus (Tramontina et al. 2007) was carried out by coating the microtiter plate with 100 μ L samples containing 30 μ g of protein for 48 h at 48°C. Incubation with a rabbit polyclonal anti-GFAP for 2 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature; the standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL.

Western blotting

The slices of the hippocampus were solubilized with SDS-stopping solution (4% SDS, 2 mM EDTA, 8% β -mercaptoethanol, and 50 mM Tris, pH 6.8) and the samples (70 μ g of total protein/track) were separated by SDS-PAGE using 10% gels (Leal et al. 2002; Cordova et al. 2004). The proteins were transferred to nitrocellulose membrane using a semidry blotting apparatus (1.2 mA/cm²; 1.5 h) as described by Bjerrum and Heegaard (1988) (Bjerrum 1988). The membranes were blocked (1 h) with 5% skim milk in TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5). ERK1/2, p38^{MAPK}, JNK1/2 total, phosphorylated forms and β -actin were detected using specific antibodies diluted in TBS-T containing BSA (2%) in the ratio 1:5,000 for anti-phospho ERK1/2, 1:1,000 for both anti-phospho P38^{MAPK}, anti-phospho JNK 1/2 and anti-total JNK 1/2, 1:40,000 for anti-total-ERK1/2, 1:10,000 for anti-total p38^{MAPK}, 1:2,000 for β -actin. The reactions were developed by chemiluminescence (LumiGLO®). All steps of blocking and incubation were followed by three times washing (5 min) of the membranes with TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%, pH 7.5).

Quantification and statistical analysis

The relative body weight was analyzed by one-way repeated measures ANOVA. Comparisons between groups in novel object recognition memory test were

performed using Mann-Whitney *U* test. Locomotor activity, S100B (CSF, serum and hippocampus) and hippocampal GFAP were analyzed by Student's *t* test.

The optical density (O.D.) of the bands was quantified using Scion Image® software. The phosphorylation level was determined as a ratio of O.D of the phosphorylated band/O.D. of the total band (Posser et al. 2007). Data are expressed as percentage of the control (considered as 100%) and the values are presented as mean \pm S.E.M. Statistical significance was assessed by Student's *t* test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Data of the relative body weights (0,7,14, 21 and 28 days) are show in Figure 1. There was no significant difference between control and BaP-treated animals.

Figure 2 shows the effects of BaP on total distance traveled by animals. As can be seen, the total distance in group treated with BaP 2mg/kg (8428.59 ± 947.08 cm) has increased significant ($p < 0.05$) in comparison to control group (5517.92 ± 673.98 cm) after 26 days of treatment.

Figure 3 shows the effect of BaP on the object recognition memory task. There was no significant difference between groups in the training trial (median [interquartile ranges] recognition indices were 51.1 [46.2 / 57.4] in the control group and 55.0 [49.7 / 61.6] in the BaP-treated group ($p = 0.549$)). However, BaP-treated animals showed a significant deficit in the short term memory. The STM retention trial presented median [interquartile ranges] recognition indices were 55.9 [52.5 / 58.4] in the control group and 45.7 [43.3 / 51.1] in the group treated with BaP ($p < 0.01$). There was no significant difference between groups in long-term memory that

showed recognition indices of 50.0 [44.6 / 67.1] on the control group and 60.3 [51.3 / 68.6] on the BaP-treated group.

Regarding the glial marker analysis it was observed a trend of increase of GFAP immunocontent in hippocampus in BaP-treated rats ($p = 0.07$) evaluated by ELISA (Figure 4). S100B immunocontent increased in the CSF ($p = 0.004$; Fig. 5A) and decreased in the serum ($p = 0.04$; Fig. 5B) in BaP-treated animals. It was not observed alteration in the hippocampal S100B immunocontent in BaP-treated rats compared to control animals (Fig. 5A)

Concerning the evaluation of MAPKs, it was observed that BaP-treated animals showed a significant decrease in the level of phosphorylation of ERK 2 ($p < 0.05$), but not on ERK1 ($p = 0,098$) (Fig.6A). Moreover, there were no alterations in the phosphorylation of JNK 1 and JNK 2 ($p = 0,816$ and $p = 0,608$, respectively) (Fig. 6B) and p38^{MAPK} ($p = 0,959$) (Fig. 6C). The total content of each MAPK was not altered by the treatment.

Discussion

In the present work we demonstrated that BaP administered in vivo induced deficit cognitive, caused changes in glial markers and decrease hippocampal ERK2 activity, an important signaling enzyme which participates in the synaptic plasticity process. All these effects indicate that BaP causes neurotoxicity in a dose that did not alter the body mass gain of the animals throughout the treatment, taken out a systemic toxicity.

Behavioral changes are often the first signs of neurotoxic effects after toxicant exposure. Subchronic oral administration of 2 mg/kg of BaP caused an increase in locomotor activity of animals. Previous study showed that administration of BaP

increased endogenous levels of monoamine (norepinephrine, epinephrine, dopamine, inter alia) in hippocampus of rat (Xia et al. 2011). The increase in adrenergic stimulation may be responsible for the increased activity observed (Stone et al., 2007). The dosage of endogenous monoamines after administration of BaP can be performed in areas directly connected to the motor control, such as cerebellum and motor cortex, likely to confirm this hypothesis.

However, our result is opposite to reported in the literature, where BaP-treated animals showed a decrease in the distance traveled after single dose treatment (Saunders et al., 2002 and 2006). Different in our study, were used higher doses of BaP (25–200 mg/kg) in these studies. Decrease in locomotor activity was also observed on the offspring of rats exposed during pregnancy to BaP (McCallister et al. 2008; Brown et al., 2007) and this effect was related to impairment of glutamate receptor subunit (NR2A, 2B and GluR1) expression. However, in our study we used adult animals exposed to BaP and changes in the glutamate receptors subunits was not described. Locomotor activity reduction can also be explained by the adrenergic stimulation produced by BaP in high doses, due to the administration of β_2 -adrenoceptor agonists and high doses of α_1 -adrenoceptor agonists produce the same effect (Consoli et al., 2007; Stone et al., 2007).

The object recognition test is a non-aversive task and analyzes the natural tendency of animals to explore the environment and discriminate new facts. Recognition memory is known as a working memory that consists of two distinct components, the act of recall and familiarity (Ennaceur and Delacour, 1988; Eichenbaum et al. 2007). In our study, BaP-treated animals showed deficits in short term memory, however, this deficiency was not observed in long-term memory. The longest time between training and testing long-term memory deteriorates the

performance of novel object recognition. Thus, the best results with this test are generally found between sixty to ninety minutes after training (Sik et al. 2003). The deficit of object recognition memory is, in part, in agreement with other studies that showed deficits in another type of memory, the spacial memory, of the Morris water maze test (Chengzi et al. 2011; Xia et al. 2011).

Among the brain structures involved in the formation and retention of memory, the hippocampus plays a key role. A study using transmission electron microscopy found neuronal ultrastructural alterations such as vacuole formation, from swollen and distorted mitochondria, endoplasmic reticulum expansion, Golgi apparatus disruption, nucleolus collapse or fragmentation and myelin sheath degeneration in hippocampal neurons of the animals treated of BaP compared with control (Chengzi et al. 2011). The dose used in this study is the same used by us, however in this study, the BaP treatment was 90 days. It is possible to suggest that the deficit in memory in rats treated with BaP, observed in this study, is related to these same changes observed in the hippocampus of animals earlier. Thus, changes in the hippocampus of animals exposed to BaP appear early, at about 30 days of treatment.

Furthermore, there seems to be a close link between the levels of neurotransmitters modified in the hippocampus, previously reported, and differences in behavioral performance, also observed in memory, in animals treated with BaP (Xia et al. 2011).

This is the first study that evaluates the impact of exposure to BaP *in vivo* on glial marker proteins GFAP and S100B, as well of cell signaling pathway the MAPKs.

Only two studies evaluated the immunocontent of GFAP in cultured brain cells after exposure of BaP. However, the aim was to evaluate the maintenance and cell

transformation after administration of BaP (Markovits et al. 1979 and Tripier et al. 1979). Moreover, recent studies, also *in vitro*, demonstrated that BaP induces activation of mitogen activated protein kinase family members, such as p38^{MAPK} and ERK, but not JNK, in HepG₂ cells and other cell types (Lin et al, 2008 and Song et al. 2011).

A restriction of *in vitro* studies is not to consider the metabolism of substances. In the case of BaP, previous studies have shown that the toxic effects of this compound are generally due to its metabolites. These studies have shown that the accumulation of both BaP and metabolites in brain tissue corresponded with the appearance of behavioral effects, demonstrating that the metabolism plays an important role in modulating BAP-induced neurotoxicity in rats (Saunders et al. 2002 and 2006). Benzo(a)pyrene is metabolized to toxic dihydrodiols (4,5; 7,8; 9,10-diols) and non-toxic hydroxy products (3- and 9[OH] B(a)P) (Baird and Ralston 1997).

Several studies have classified BaP and its metabolites as potent oxidants. The effects of BaP on antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and in the malondialdehyde (MDA) levels are considered as an index of oxidative tissue damage (Saunders et al. 2006).

The CNS is extremely susceptible to attack by reactive oxygen species (ROS) derived from BaP metabolism due to its high oxygen consumption, high iron and lipid content and low levels of antioxidants. Oxidative stress can cause alterations in gene expression, impair cellular signaling, disrupt membrane integrity, alter neurotransmission and cause neuronal cell death (Lebel 1991). Astrocytes are also responsible for the main antioxidant defense in brain tissue and oxidative stress is a common feature in several neurodegenerative diseases (Jellinger 2009).

The trend observed in immunoccontent of GFAP in the hippocampus of BAP-treated animals would probably be confirmed by increasing the period of treatment of animals. An important point that should be taken into consideration is that the levels of BaP found in the environment are reflective of increasing accumulations over a long period of time whereas the doses used in laboratory are acute, subchronic (30 days) or chronic (90 days). Thus, the actual effect of BaP on organisms may be more intense. It should be considered that increased GFAP does not signify only astrogliosis in a harmful response to an injury, but may be also a protective reaction of the CNS (Liberto et al. 2004).

S100B calcium binding protein, expressed and secreted by astrocytes in vertebrate brain, intracellularly, binds to many protein targets, possibly modulating cytoskeleton plasticity, cell proliferation and astrocyte energy metabolism (Van Eldik and Wainwrig, 2003). We did not find any changes in S100B immunoccontent in hippocampus of BaP-treated animals. On the other hand, the present study showed that CSF S100B is high in the BaP-treated animals. In serum, unlike the CSF, BaP-treated animals showed a decrease in the levels of S100B. Studies indicate a link between neurodegenerative disease and exposure to environment chemicals (Spencer 1992; Tilson 2000). An overproduction of S100B by activated glia can lead to exacerbation of neuroinflammation and neuronal dysfunction. As an example Guillain-Barré syndrome is an immune-mediated inflammatory disease in the peripheral nervous system. Patients with this syndrome showed, among other features, an increase of S100B in the CSF (Wang, 2012). A decrease in serum S100B, as observed in our study, was recently observed in Alzheimer's disease patients (Chaves et al. 2010). It should be noted that the expression and secretion of S100B are not necessarily interdependent events (Gonçalves et al. 2008).

A functional activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) is responsible for the biological effects of BaP. The binding and activation of this receptor by BaP, and subsequent entry into the nucleus, induces transcriptional activation of genes involved in metabolism of this substance (Schmidt and Bradfield, 1996). Metabolites of BaP are substances known to cause DNA damage. In response to DNA damage, some transcription factors are activated, such as p53 (Lin et al. 2008). The activation of p53 is associated with its phosphorylation which leads to a reduced interaction between p53 and its negative regulator, oncoprotein MDM2. Previous studies have reported that mitogen-activated protein kinases (MAPKs), such as ERK, p38^{MAPK} and JNK to be responsible for p53 phosphorylation (Huang et al. 1999). The MAPK signaling pathways regulate many cellular processes, including gene expression, differentiation and cell death and dysfunction of the effectors comprising these pathways has been linked to many pathological processes. p38^{MAPK} phosphorylates p53 in response to DNA damage and stimulates the transcription of several proapoptotic p53 target genes. Studies have shown that treatment with a metabolite of the BaP induces activation of ERK1/2 and p38 but not JNK in HL60 cells (Lin et al. 2008).

Reactive oxygen species also are reported to play a key role in cell signaling, and activation of MAPKs is known to play a major role in ROS-signaling pathways. The imbalance in the antioxidant system induced by BaP, probably also plays a key role in alteration of MAPK. In our study, only ERK 2 was altered in BaP-treated animals. Studies have shown ERK signalling as a crucial player in synaptic and neuronal plasticity and also in learning and memory. In this context it is interesting to note that there are multiple upstream regulators of ERK in the hippocampus, such as: norepinephrine, dopamine, nicotinic ACh, muscarinic ACh, histamine, estrogen,

serotonin, brain derived neurotrophic factor (BDNF), NMDA receptors, metabotropic glutamate receptors, AMPA receptors, voltage-gated calcium channels, reactive oxygen species, various PKC isoforms, PKA, nitric oxide, NF1, and multiple ras isoforms and homologs (Sweatt 2004). As mentioned above, one study found that the administration of BaP caused an increased in levels of endogenous monoamine neurotransmitters (Xia et al. 2011). Thus, it seems to be a link between changes in the levels of endogenous monoamines in the hippocampus, changes in the phosphorylation of ERK (as observed in our study) with deficits in memory and learning (as in our studies and others). Although ERK1/2 has generally been associated with cell survival and proliferation (Torii et al. 2004), the role of ERK1/2 is more diverse since it is reported to be pro-survival in some cells and proapoptotic in other cell lines (Iryo et al. 2000). Depending on cell type MAP kinases are differentially involved in the regulation of cell survival and apoptosis (Mukherjee et al. 2009). As mentioned above, studies of cells observed an increase in phosphorylation of p38^{MAPK}. This was not observed in our study; however, as the effects of exposure to BaP may be cumulative results, an increase in the time of treatment of animals with BaP could get this result.

In conclusion, BaP affects different systems in the body, including neurons and glial cells. The BaP-induced effects on behavioral parameters, on secretion S100B in CSF and serum, and decreased ERK 2 in the hippocampus may be due to oxidative damage by stress produced by the powerful oxidizing effect of BaP. However, further studies are needed to clarify the mechanisms involved in the neurotoxicity produced by BaP.

Acknowledgements

The authors would like to thank to Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva for scientific support, to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the fellowship.

Conflict of interest statement

The authors declared that there are no conflicts of interest.

References

- Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, Cunha AB, Cereser KM, Santin A, Gottfried C, Salvador M, Kapczinski F, Goncalves CA (2007) Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res* 41:523–529
- ATSDR (1995). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
- Baird WM, Ralston SL (1997) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Comprehensive Toxicology, Chemical Carcinogens and Anticarcinogens*, Bowden GT, Fischer SM (eds). Elsevier Press: Amsterdam; 12: 171–200
- Bjerrum OJH, N.H.H. (1988) *CRC handbook of immunoblotting of proteins*. vol. I. CRC press.
- Brown LA, Khoubouei H, Goodwin JS, Irvin-Wilson CV, Ramesh A, Sheng L, McCallister MM, Jiang GC, Aschner M, Hood DB (2007) Down-regulation of early ionotropic glutamate receptor subunit developmental expression as a mechanism for observed plasticity deficits following gestational exposure to benzo(a)pyrene. *Neurotoxicology*, 28:965-978.
- Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(1):50–83

Chaves ML, Camozzato AL, Ferreira ED, Piazenski I, Kochhann R, Dall'Igna O, Mazzini GS, Souza DO, Portela LV (2010) Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *J Neuroinflamm*;7:6.

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem Rev* 101(8):2449–2476

Chengzi C, Yan T, Shuqun C, Xuejun J, Youbin Q, Yinyin X, Quian T, Baijie T (2011) New candidate proteins for Benzo(a)pyrene-induced spatial learning and memory deficits. *J. Toxicol. Sci.* 36:163-171.

Consoli, D., Leggio, G.M., Mazzola, C., Micale, V., Drago, F., 2007. Behavioral effects of the b3 adrenoceptor agonist SR58611A: is it the putative prototype of a new class of antidepressant/anxiolytic drugs? *Eur. J. Pharmacol.* doi:10.1016/j.ejphar.2007.06.048.

Cordova FM, Rodrigues AL, Giacomelli MB, Oliveira CS, Posser T, Dunkley PR, Leal RB (2004) Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res* 998 (1):65-72.

Creese I, Burt DR, Snyder SH (1976) Dopamine-receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*; 192:481-483.

Das M, Mukhtar H, Seth P (1985) Distribution of benzo(a)pyrene in discrete regions of rat brain. *Bull Environ Contam Toxicol* 35:500–504.

de Lima MNM, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schröder N (2005a) Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp Gerontol* 40(6): 506–511.

de Lima MNM, Polydoro M, Laranja DC, Bonatto F, Bromberg E, Moreira JC, Dal-Pizzol F, Schröder N (2005b) Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur J Neurosci* 21(9):2521–2528.

Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 1793:1008–1022.

Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C (2007) The medial temporal lobe and recognition memory. *Annual Review of Neuroscience* 30: 123–152.

Ennaceur A and Delacour J (1988) A new one-trial for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31: 47-59.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res* 25:1439–51.

Enomoto M, Tierney WJ, Nozaki K (2008) Risk of human health by particulate matter as a source of air pollution—comparison with tobacco smoking. *J Toxicol Sci* 33:251–267.

Gao M, Li Y, Long J, Shah W, Fu L, Lai B, Wang Y (2011) Induction of oxidative stress and DNA damage in cervix in acute treatment with benzo[a]pyrene. *Mutation Research* 719: 52–59.

Goncalves CA, Leite MC, Nardin P (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem* 41:755–63.

Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y, Dong Z (1999) p38 kinase mediates UV induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J. Biol. Chem.* 274:12229–12235

IARC (1973). Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man* 3: 1–271.

IARC, 2012. Benzo[a]pyrene. NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Chem. Man v: 92.*

Iryo Y, Matsuoka M, Wispriyono B, Sugiura T, Igisu H (2000) Involvement of the extracellular signal regulated protein kinase (ERK) pathway in the induction of apoptosis by cadmium chloride in CCRFCEM cells. *Biochem. Pharmacol.* 60:1875–1882.

Jacobson JL and Jacobson SW (1997) Evidence for PCBs as neurodevelopmental toxicants in humans. *Neurotoxicology* 18:415– 424.

Jellinger KA (2009) Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm* 116:1111–62.

Jerusalinsky D, Ferreira MB, Walz R, Da Silva RC, Bianchin M, Ruschel AC, Zanatta MS, Medina JH, Izquierdo I (1992) Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. *Behav Neural Biol* 58(1):76–80

Kim EK, Choi EJ (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802(4): 396–405

Kim HS, Kwack SJ, Lee BM (2000) Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo[a]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[a]pyrene. *Chemico-Biological Interactions* 127:139–150.

Leal RB, Cordova FM, Herd L, Bobrovskaya L, Dunkley PR (2002) Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol* 178 (1):44-51.

Lebel C (1991) Oxygen radicals: common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 341–346.

Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, Almeida LM, Gottfried C, Goncalves CA (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* 169:93–99.

Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW (2004) Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89:1092–1100

Lin T, Mak NK, Yang MS (2008) MAPK regulate p53 dependent cell death induced by benzo[a]pyrene: Involvement of p53 phosphorylation and acetylation. *Toxicology* 247:145–153.

Liu SH, Wang JH, Chuu JJ, Lin-Shiau SY (2002) Alterations of motor nerve functions in animals exposed to motorcycle exhaust. *J Toxicol Environ Health A.* 65(11):803-812.

Lubenov EV and Siapas AG (2009) Hippocampal theta oscillations are travelling waves. *Nature*, 459: 534-539.

Markovits P, Maunoury R, Tripier MF, Coulomb B, Levy S, Papadopoulo D, Vedrenne C, Benda P (1979) Normal and benzo(a)pyrene-transformed fetal mouse brain cell. I. Tumorigenicity and immunochemical detection of glial fibrillary acidic protein. *Acta Neuropathol*, 47(3):197-203.

McCallister MM, Maguire M, Ramesh A, Aimin Q, Liu S, Khoshbouei H, Aschner M, Ebner FF, Hood DB (2008). Prenatal exposure to benzo(a)pyrene impairs later-life cortical neuronal function. *NeuroToxicology* 29: 846–854.

Mukherjee JJ, Gupta SK, Kumar S (2009) Inhibition of benzopyrene-diol-epoxide (BPDE)-induced bax and caspase-9 by cadmium: Role of mitogen activated protein kinase. *Mutation Research* 661:41–46.

Netto CB, Conte S, Leite MC, Pires C, Martins TL, Vidal P, Benfato MS, Giugliani R, Goncalves CA (2006) Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res* 37:683–686.

OECD (1995). Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodent. <http://www.oecd.org/publications>. Paris: Head of Publications Service.

Olfert ED, Cross BM, McWilliam A (1998). Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Consejo Canadiense de Protección de Los Animales, v.1.

Posser T, de Aguiar CB, Garcez RC, Rossi FM, Oliveira CS, Trentin AG, Neto VM, Leal RB (2007) Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Arch Toxicol* 81 (6):407-414.

Runchel C, Matsuzawa A, Ichijo H (2011) Mitogen-activated protein kinases in mammalian oxidative stress responses. *Antioxid Redox Signal* 15(1):205–218

Sanderson JL, Dell'Acqua ML (2011) AKAP signaling complexes in regulation of excitatory synaptic plasticity. *Neuroscientist* 17(3):321–336

Saunders CR, Ramesh A, Shockley DC (2002) Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo(a)pyrene. *Toxicol Lett*; 129:33–45.

- Saunders CR, Das SK, Ramesh A, Shockley DC, Mukherjee S (2006) Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *J Appl Toxicol*; 26:427–438.
- Sik A, van Nieuwehuyzen P, Prickaerts J, Blokland A (2003) Performance of different mouse strains in an object recognition task. *Behav. Brain Res.* 147:49-54.
- Schmidt JV, Bradfield CA, 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:55–89.
- Schröder N, O'Dell SJ, Marshall JF (2003) Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 49:89–9.
- Song MK, Kim YJ, Song M, Choi HS, Park YK, Ryu JC (2011) Polycyclic aromatic hydrocarbons induce migration in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) through reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signal transduction. *Cancer Sci*, 102(9):1636-44.
- Spencer P (1992) Are human neurodegenerative disorders linked to environmental chemicals with excitotoxic properties? *Ann. NY Acad. Sci*; 648:154–160.
- Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76(1):1–10
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current Opinion in Neurobiology* 14:1–7.
- Stone, E.A., Quartermain, D., Lin, Y., Lehmann, M.L. (2007) Central α 1-adrenergic system in behavioral activity and depression. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1063–1075
- Takeda K and Ichijo H (2002) Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7:1099–1111.
- Tilson H (2000) Neurotoxicity risk assessment guidelines: developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology* 21:189–194.
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5(3):173–183

Torii S, Nakayama K, Yamamoto T, Nishida E (2004) Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J. Biochem. (Tokyo)* 136:557–561.

Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, Andrezza AC, Gottfried C, Kapczinski F, Goncalves CA (2007) Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods* 162:282–286.

Tripier MF, Markovits P, Papadopoulo D, Toga M (1979) Normal and benzo(a)pyrene-transformed fetal mouse brain cells. II. Ultrastructural study. *Acta Neuropathol.* 47(3):205-11.

Van Eldik LJ and Wainwright MS (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 21:97–108.

Vicente E, Boer M, Leite M, Silva M, Tramontina F, Porciuncula L, Dalmaz C, Goncalves CA (2004) Cerebrospinal fluid S100B increases reversibly in neonates of methyl mercury-intoxicated pregnant rats. *Neurotoxicology* 25:771–777.

Wang XK, Zhang HL, Meng FH, Chang M, Wang YZ, Jin T, Mix E, Zhu J (2012) Elevated levels of S100B, tau and pNFH in cerebrospinal fluid are correlated with subtypes of Guillain-Barré syndrome. *Neurol Sci.* DOI: 10.1007/s10072-012-1092-z

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E., 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326–1331.

Xia Y, Cheng S, He J, Liu X, Tang Y, Yuan H, He L, Lu T, Tu B, Wang Y, (2011) Effects of subchronic exposure to benzo[a]pyrene (B[a]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague–Dawley rat. *NeuroToxicology* 32:188–198.

Yan T, Chengzhi C, Haiyan Y, Baijie T. (2010) Distribution of benzo[a]pyrene in discrete regions of rat brain tissue using light microscopic autoradiography and gamma counting. *Toxicol Environ Chem* 92:1309-1317.

Zola-Morgan, S.M. and Squire, L.R. (1990). The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science*, 250, 288-290.

Legends of figures

Figure 1. Effects of BaP on relative weight variation of rats. Benzo[a]pyrene 2 mg/kg (BaP) or vehicle (corn oil) were administered orally (by gavage) once a day during 28 days. Relative Weight = (weight of the animal X 100) / weight of the animal on day 1. Values represent mean \pm SEM (n = 12, one-way repeated measurements ANOVA, p < 0.05).

Figure 2. Effects of BaP on spontaneous locomotor activity of rats. Benzo[a]pyrene 2 mg/kg (BaP) or corn oil (control) administered orally (by gavage) once a day during 28 days. Each column represents the mean \pm SEM. (n=12 per group). * p < 0.05 vs. vehicle - treated group by Student's *t*- test.

Figure 3. Effect of BaP on recognition memory deficits of rats. Benzo[a]pyrene 2 mg/kg (BaP) or vehicle (corn oil) were administered orally (by gavage) once a day during 28 days. A) Training B) Short-term memory test (STM) was performed 1.5h after training and C) Long-term memory (LTM) at 24 h after training. "Recognition Index" expressed by the ratio TN/TF+TN, TF= time spent exploring the familiar object and TN= time spent exploring the novel object. Data expressed as median [interquartiles ranges], (n = 12). Comparisons between groups - Mann-Whitney *U* test.* p < 0.05.

Figure 4. Effect of BaP on GFAP content in the hippocampus of rats. Benzo[a]pyrene 2 mg/kg (BaP) or vehicle (corn oil) were administered orally (by gavage) once a day during 28 days. Hippocampi were dissected out and the contents of GFAP were measured by ELISA. Values (GFAP optical densities) are mean \pm standard error of twelve rats in each group. *Significantly different between groups (Student's *t*- test, p < 0.05).

Figure 5. Effect of BaP on S100B levels in the hippocampus, cerebrospinal fluid (CSF) and serum of rats. Benzo[a]pyrene 2 mg/kg (BaP) or vehicle (corn oil) were administered orally (by gavage) once a day during 28 days. A. Hippocampal S100B content. B. Cerebrospinal fluid (CSF) S100B content (collected by cisterna magna puncture). C. Serum S100B content (collected from the caudal cava vena). The S100B content was measured by ELISA. Values are mean \pm standard error (n = 12 per group). *Significantly different between groups (Student's *t*-test, $p < 0.05$).

Figure 6. Effect on MAPK's in the hippocampus of rats submitted to BaP. Benzo[a]pyrene 2 mg/kg (BaP) or vehicle (corn oil) were administered orally (by gavage) once a day during 28 days. Phosphorylation of p38^{MAPK}, JNK1/2, ERK1/2 was detected by specific antibodies against the biphosphorylated region of each kinase and the reactions were developed by ECL. The panels show representative western blot and quantitative analysis of phosphorylation for each MAPK. (A) ERK1/2; (B) JNK 1/2 and (C) p38^{MAPK}. The data are expressed as percentages of the control (considered as 100%). Values are mean \pm standard error of 5-6 rats in each group. *Significant differences from control (Student's *t*-test, $p < 0.05$).

Figures

Figure 1

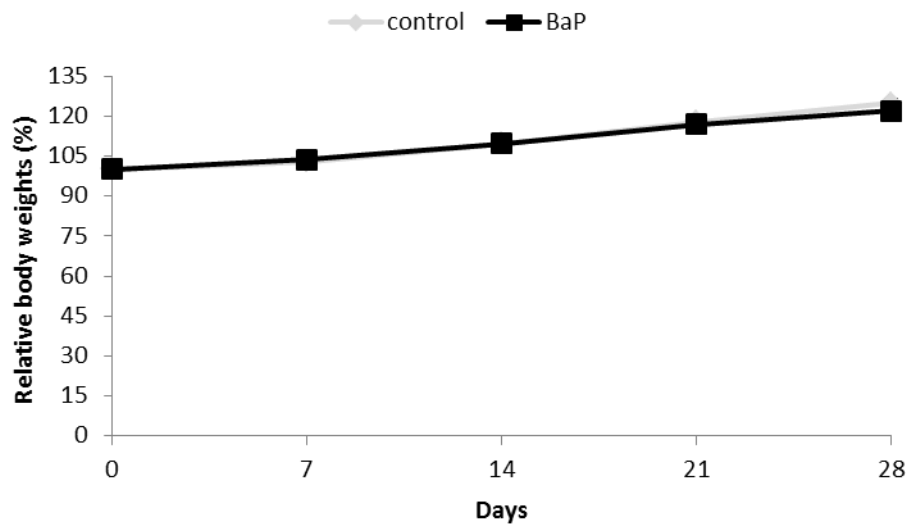


Figure 2

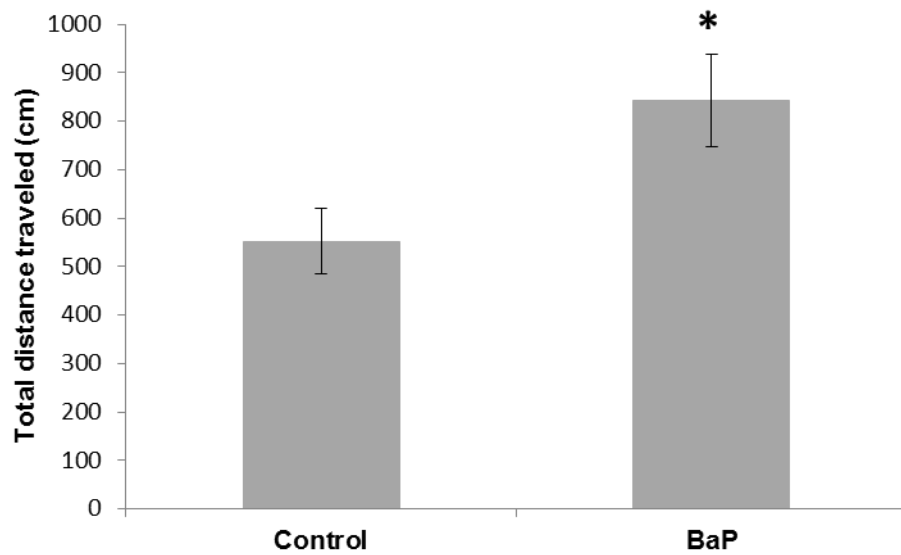


Figure 3

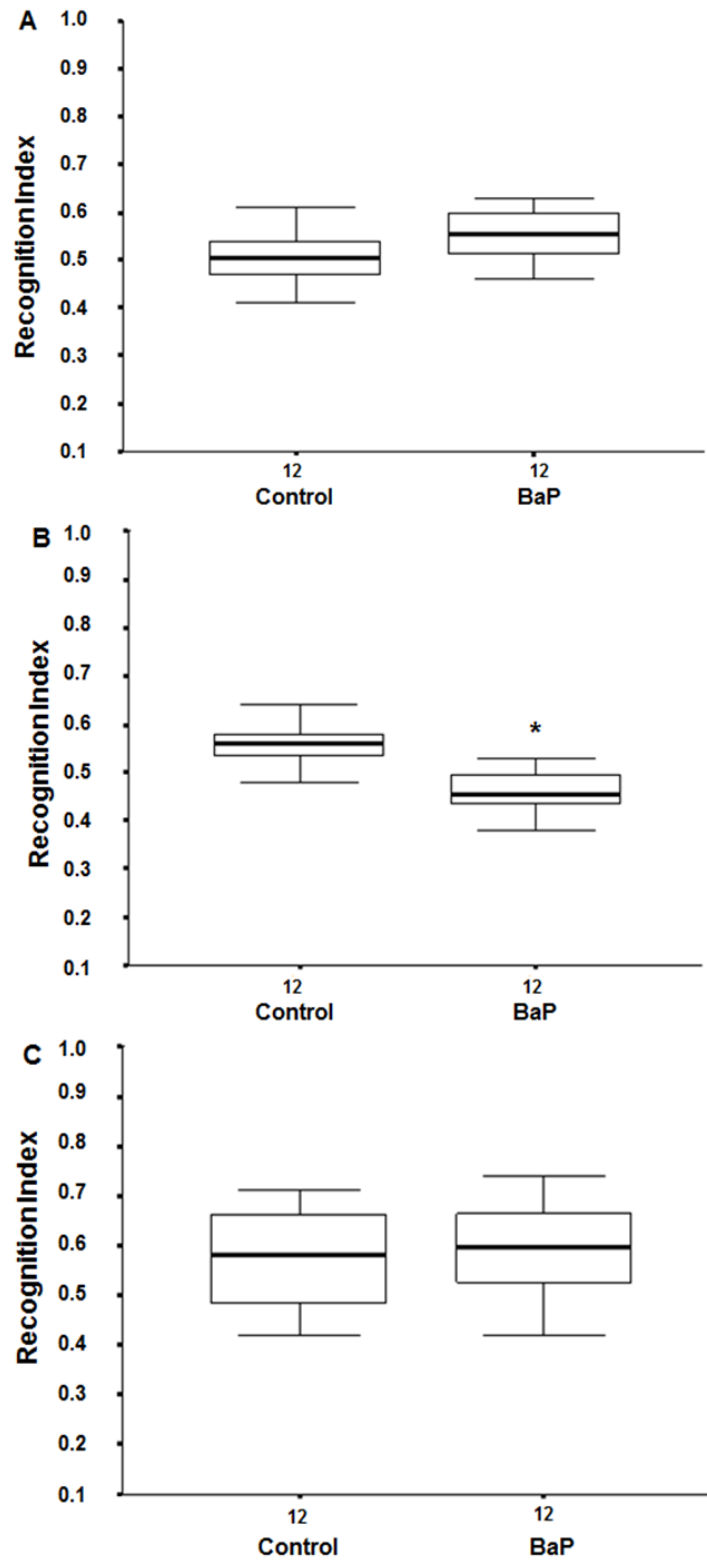


Figure 4

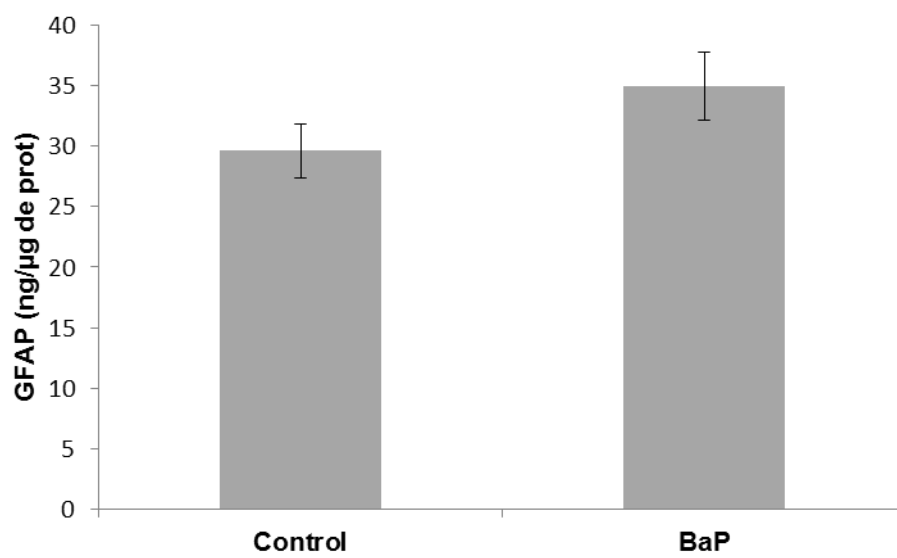


Figure 5

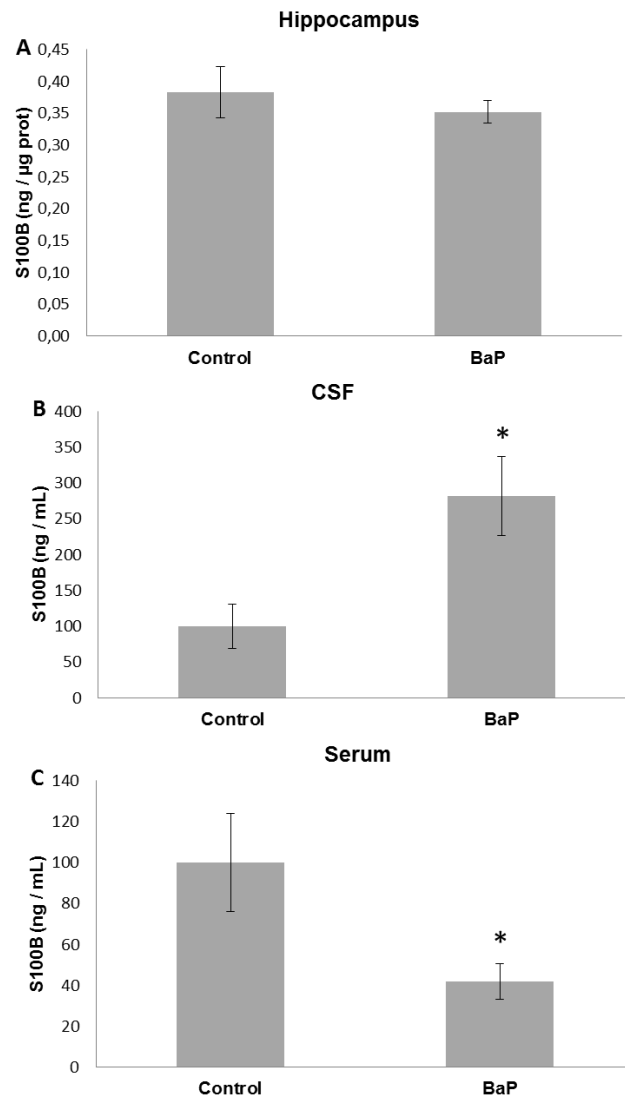
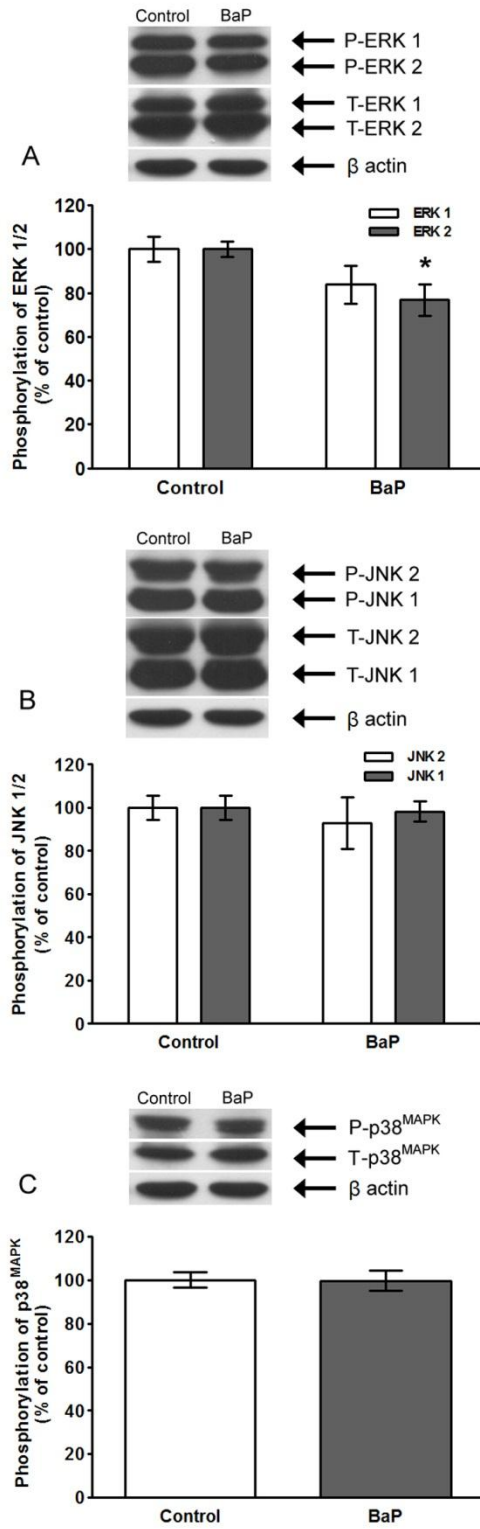


Figure 6



PARTE III

Discussão

1.1 Resumos dos resultados

Parâmetro Avaliado	Fêmeas (120 dias)	Machos (120 dias)	Machos (90 dias)
Dose BaP Administrada	1 mg/kg	2 mg/kg	2 mg/kg
Peso Corporal	Inalterado	Inalterado	Inalterado
Atividade Locomotora	Aumentada	Aumentada	Aumentada
Memória Curta-duração	—	Tendência de diminuição	Diminuída
Memória Longa-duração	Inalterada	Inalterada	Inalterada
Dano ao DNA	Aumentado	Aumentado	—
Conteúdo de GFAP (hipocampo)	—	—	Tendência de aumento
Conteúdo S100B (hipocampo)	—	—	Inalterado
Conteúdo de S100B (LCR)	—	—	Aumentado
Conteúdo de S100B (soro)	—	—	Diminuído
MAPKs (hipocampo) (p³⁸MAPK, ERK 1/2, JNK 1/2)	—	—	ERK 2 Diminuída

O papel de BaP como um potente agente mutagênico e carcinogênico já está bem definido (IARC 1973), no entanto, só recentemente os efeitos neurotóxicos do BaP têm recebido atenção. Tendo em vista que ainda existem lacunas sobre os mecanismos por meio dos quais BaP induz toxicidade, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de BaP em parâmetros comportamentais e neuroquímicos.

Um achado interessante de nosso estudo está relacionado ao efeito de BaP (em doses baixas) sobre a atividade locomotora. Tanto nos machos quanto nas fêmeas BaP aumentou a atividade dos animais, resultado oposto ao encontrado na literatura, onde a atividade locomotora apresentou-se diminuída após a exposição a altas doses deste composto (Saunders et al. 2002 e 2006). Nestes estudos, utilizando doses únicas de BaP (25-200 mg/kg) foi observado uma correlação significativa entre os efeitos neurotóxicos de BaP e as concentrações cerebrais e plasmáticas dos metabolitos de BaP, sugerindo que o metabolismo desempenha um papel importante na modulação dos efeitos neurocomportamentais de BaP. Assim, esta diminuição na atividade locomotora pode ser reflexo de uma toxicidade sistêmica causada por este composto em doses tão elevadas. A diferença entre os nossos resultados e aqueles da literatura pode ser explicada pela dose utilizada e o tempo de tratamento.

Estudos anteriores já demonstraram que BaP prejudica o processo de memória e o aprendizado (Xia et al., 2011, Chengzi et al., 2011). Em nosso estudo, nós observamos déficit na memória de curta duração dos animais tratados com BaP utilizando o Teste de Reconhecimento de Objetos, que é considerado uma tarefa não aversiva para os animais. A memória de reconhecimento é conhecida como uma memória de trabalho que envolve o ato de recordar e a familiaridade. As bases anatômicas que envolvem estes processos estão sendo estudadas, mas a

participação do hipocampo parece fundamental (Squire et al., 2007), visto que um comprometimento na atividade ou até mesmo uma lesão desta região cerebral prejudica o desempenho da memória na tarefa de reconhecimento de objetos (Clark et al., 2000; Hammond et al., 2004).

Alterações na ultraestrutura de neurônios hipocampais de ratos tratados oralmente com BaP (2mg/kg por 90 dias) foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Estes neurônios apresentaram alterações como: vacuolização de mitocôndrias, desnaturação da bainha de mielina, expansão do retículo endoplasmático, interrupções no aparato de Golgi e irregularidades do núcleo (Chengzhi et al., 2011). Estas alterações podem explicar, em parte, o déficit de memória apresentado pelos animais tratados com BaP em nosso estudo e nos demais estudos que envolvem memória e aprendizado após a exposição ao BaP.

As fêmeas não foram testadas para a memória de curta duração, somente na memória de longa duração, onde todos os grupos (machos e fêmeas) não diferiram dos resultados apresentados pelos animais dos respectivos grupos controles. Os ratos machos de 120 dias de idade apresentaram uma tendência de déficit na memória de curta duração, tendência esta que foi comprovada após o tratamento de um grupo contendo um número maior de animais (capítulo III).

O Ensaio Cometa ou Eletroforese Gel de célula única é uma técnica rápida e eficiente quando usada para quantificar múltiplas classes de danos ao DNA e detectar os efeitos do reparo ao DNA em células individualizadas de mamíferos. O objetivo da técnica não é detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que podem ser reparadas, e se não reparadas, podem resultar em mutação (Fairbairn et al., 1995). Esta técnica é utilizada amplamente na genética médica, genética toxicológica, ecotoxicológica, em diagnósticos e tratamentos médicos, medicina

ambiental, ocupacional, biomonitoramento ambiental, além de outras aplicações. Sendo assim, estando o BaP amplamente distribuído no ambiente, esta técnica torna-se uma ferramenta útil para a identificação rápida dos danos ao DNA causados por este composto (Contijo *et al.*, 2003).

De acordo com os nossos resultados, BaP induziu danos graves ao DNA tanto nos machos quanto nas fêmeas. Estes resultados demonstraram que a genotoxicidade foi observada em uma dose encontrada na água e nos alimentos.

O SNC é extremamente suscetível ao ataque de espécies reativas de oxigênio derivadas do metabolismo de BaP, devido ao seu elevado consumo de oxigênio, alto teor de lipídios e baixo nível de defesas antioxidantes. O estresse oxidativo pode causar alterações na expressão gênica, prejudicar a sinalização celular, afetar a integridade da membrana, alterar a neurotransmissão e causar a morte celular neuronal (Lebel, 1991). O estresse oxidativo induzido pelo BaP pode contribuir significativamente para os danos causados ao DNA, sendo um dos principais mecanismos atribuídos aos efeitos tóxicos do BaP.

Nosso trabalho é o primeiro que avalia os efeitos da administração de BaP *in vivo* sobre os astrócitos, através dos marcadores GFAP e da proteína S100B, e sobre a via de sinalização celular pelas MAPKs. Estudos anteriores, *in vitro*, mostraram que BaP altera os níveis de GFAP (Markovits *et al.* 1979 and Tripier *et al.* 1979) e das MAPKs, ERK 1/2 e p38^{MAPK} (Lin *et al.* 2008 and Song *et al.* 2011). A proteína S100B não foi testada anteriormente, tanto *in vitro* ou *in vivo*.

O conteúdo de GFAP apresentou uma tendência a astrogliose. Considerando que no ambiente a exposição ao BaP é constante, provavelmente, um aumento no tempo de administração apresentaria um resultado significativo. Deve ser considerado que um aumento no imunoc conteúdo de GFAP não significa apenas uma

astroglíose em resposta a uma lesão prejudicial, mas pode ser também uma reação de proteção do SNC (Liberto et al. 2004).

Em nosso estudo, observamos um aumento nos níveis de S100B no líquido e uma diminuição no soro dos animais tratados com BaP. Tanto o aumento de S100B no líquido como a diminuição no soro também foram observados em doenças neurodegenerativas (Wang, 2012; Chaves et al. 2010). Estudos indicam uma ligação entre doenças neurodegenerativas e a exposição a produtos químicos do ambiente (Spencer 1992; Tilson 2000).

Dentre as MAPKs estudadas em nosso estudo, somente a ERK 2 mostrou-se diminuída. Estudos têm demonstrado que ERK exerce um papel crucial na plasticidade sináptica e neuronal e também nos processos de aprendizado e memória. Neste contexto, é interessante notar que há múltiplos reguladores da ERK no hipocampo: noradrenalina, dopamina, acetilcolina, histamina, estrogênio, serotonina, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), os receptores NMDA, os receptores de glutamato metabotrópicos AMPA, canais de cálcio voltagem-dependentes, espécies reativas de oxigênio, várias isoformas da PKC, PKA, óxido nítrico, NF1 e múltiplas isoformas ras e homólogos (Sweatt 2004). No que se refere ao BaP foi demonstrado que a administração causou um aumento nos níveis endógenos das monoaminas (Xia et al. 2011). Assim, sugerimos que pode haver uma relação entre as alterações nos níveis de monoaminas endógenas no hipocampo e as mudanças na fosforilação de ERK e os déficits de memória e aprendizado também observados em nosso estudo.

Um ponto importante que deve ser levado em consideração, é que embora as concentrações de BaP utilizadas neste estudo (1 mg/kg e 2 mg/kg) correspondam ao nível de contaminação em fumantes, consumidores de carne defumada, grelhada ou

peixe, ou ainda de indivíduos com exposição ocupacional pesada (ATSDR, 1995), os níveis de BaP encontrados no ambiente são reflexo de acumulações durante um longo período de tempo (Saunders et al., 2006), enquanto as doses utilizadas em laboratório são agudas (única dose), subcrônicas (30 dias) ou crônicas (90 dias). Assim, os efeitos reais de BaP no organismo podem ser mais intensos.

Conclusões

Em conclusão, BaP foi capaz de induzir déficit cognitivo e dano ao DNA, e pela primeira vez ao nosso conhecimento, alterações astrogliais (proteína S100B no líquido e soro, e tendência de GFAP hipocampal) e na via de sinalização MAPK *in vivo* em doses encontradas como contaminante de águas e alimentos. Nossos resultados contribuem para a compreensão dos mecanismos de toxicidade de BaP e apontam para a necessidade de uma legislação mais eficiente para este composto, visto que pode acarretar sérios problemas à saúde.

Referências Bibliográficas

- Agha, A.M., El-Fattah, A.A., Al-Zuhair, H.H., et al., 2001. Chemopreventive effect of *Ginkgo biloba* extract against benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice: amelioration of doxorubicin cardiotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res*, 20:39-50.
- Archibong, A.E., Inyang, F., Rameshm, A., Greenwood, M., Nayyar, T., Kopsombut, P., et al., 2002. Alteration of pregnancy related hormones and fetal survival in F-344 rats by inhaled benzo(a)pyrene. *Reprod. Toxicol*, 16:801–808.
- ATSDR, 1995.. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Atlanta.
- Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A., 2008. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 3ª edição, Artmed
- Bettin, S.M., Franco, D.W., 2005. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas, SP*, 25(2)
- BRASIL, 2004. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
- BRASIL, 2007. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 02, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
- Camargo, M.C.R., Toledo, M.C.F., 2002a. Avaliação da contaminação de diferentes grupos de alimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Braz J Food Technol*, 5:19-26.
- Camargo, M.C.R., Toledo, M.C.F., 2002b. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – uma revisão. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 36(1).
- Caruso, MSF (2007). Otimização de metodologia para determinação de benzo(a)pireno em cachaças por CLAE com detecção de fluorescência e avaliação

de sua ocorrência. 119p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo.

Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.*, 1;410(6824):37-40.

Chaves, M.L., Camozzato, A.L., Ferreira, E.D., Piazenski, I., Kochhann, R., Dall'Igna, O., Mazzini, G.S., Souza, D.O., Portela, L.V., 2010. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *J Neuroinflamm*;7:6.

Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M.H., 2001. MAP kinases. *Chem Rev*, 101(8):2449-76.

Chengzi, C., Yan, T., Shuqun, C., Xuejun, J., Youbin, Q., Yinyin, X., Quian, T., Baijie, T., 2011. New candidate proteins for Benzo(a)pyrene-induced spatial learning and memory deficits. *J Toxicol Sci*, 36:163-171.

Chiapperino, D., Cai, M., Sayer, J.M., Yagi, H., Kroth, H., Masutani, C., Hanaoka, F., Jerina, D.M., Cheh, A.M., 2005. Error-prone Translesion Synthesis by Human DNA Polymerase η on DNA-containing Deoxyadenosine Adducts of 7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *J Biol Chem*, 280:39684-39692.

Clark, R.E., Zola, S.M., Squire, L.R. 2000. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J. Neurosci.* 20: 8853– 8860.

Contijo AMM, Tice R (2003). Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora da ULBRA.

Das, M., Mukhtar, H., Seth, P., 1985. Distribution of benzo(a)pyrene in discrete regions of rat brain. *Bull Environ Contam Toxicol* 35:500–504.

Donato, R., 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33(7):637-668.

Donato, R., 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 60(6):540-551.

European Commission, 2002. Health and Consumer Protection Directorate-General. Polycyclic aromatic hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects. SCF/CS/CNTM/PAH/29 ADD1 Final. Brussels.

EC. Commission of the European Communities, 2005a. Commission Regulation (EC) n° 208/2005 of 4 February 2005a amending Regulation (EC) n° 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons. Official Journal L 034:3-5.

Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., Lee, Y.L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25(9-10):1439-1451.

Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339, 37-59.

Goyal, P.K., Verma, P., Sharma, P., Parmar, J., Agarwal, A., 2010. Evaluation of Anti-Cancer and Anti-Oxidative Potential of *Syzygium Cumini* Against Benzo[a]pyrene (BaP) Induced Gastric Carcinogenesis in Mice. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 11:753-758.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*, second ed. New York Oxford University, Clarendon Press, USA, 466-495.

Hammond, R.S., Tull, L.E., and Stackman, R.W. On the delaydependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 82: 26–34, 2004.

Hood, D.B., Nayyar, T., Ramesh, A., Greenwood, M., Inyang, F., 2000. Modulation in the developmental expression profile of Sp1 subsequent to transplacental exposure of fetal rats to desorbed benzo-(a)pyrene following maternal inhalation. *Inhal. Toxicol.* 12, 511–535.

IARC, 1973. Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. In: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, 91–136.

Jayasekara, S., Sharma, R.P., Drown, D.B., 1992. Effects of benzo[a]pyrene on steadystate levels of biogenic amines and metabolizing enzymes in mouse brain regions. *Ecotoxicol. Environ* 24:1–12.

- Jessen, K.R., 2004. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36(10):1861-1867.
- Kamaraj, S., Ramakrishnan, G., Anandakumar, P., Jagan, S., Devaki, T., 2009. Antioxidant and anticancer efficacy of hesperidin in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice. *Invest. New Drugs* 27:214–222.
- Kazantsev, A.G., 2007. *Drug News Perspect*, 20:501-509.
- Kim, K.B., Lee, B.M., 1997. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Letters* 113:205-212.
- Kim, E.K., Choi, E.J., 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1802(4):396-405.
- Lebel C., 1991. Oxygen radicals: common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 341–346.
- Liberto, C.M., Albrecht, P.J., Herx, L.M., Yong, V.W., Levison, S.W., 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89:1092–1100
- Lin, T., Mak, N.K., Yang, M.S., 2008. MAPK regulate p53 dependent cell death induced by benzo[a]pyrene: Involvement of p53 phosphorylation and acetylation. *Toxicology*, 247:145–153.
- Markovits, P., Maunoury, R., Tripiet, M.F., Coulomb, B., Levy, S., Papadopoulo, D., Vedrenne, C., Benda, P., 1979. Normal and benzo(a)pyrene-transformed fetal mouse brain cell. I. Tumorigenicity and immunochemical detection of glial fibrillary acidic protein. *Acta Neuropathol*, 47(3):197-203.
- Mukherjee, J.J., Gupta, S.K., Kumar, S., 2009. Inhibition of benzopyrenedi-oxide (BPDE) induced bax and caspase9 by cadmium: Role of mitogen activated protein kinase. *Mutation Research*, 661 41–46.
- Paul, S., Bhattacharyya, S.S., Samaddar, A., Boujedaini, N., Khuda-Bukhsh, A.R., 2011. Anticancer potentials of root extract *Polygala senega* against benzo[a]pyrene-induced lung cancer in mice. *J Chin Integr Med*, 9(3):320-327.

Perea, G., Araque, A., 2005. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38(3-4):375-378.

Pereira-Neto, A.D., Moreira, J.C., Dias, A.E.X.O., Arbilla, G., Ferreira, L.F.V., Oliveira, A.S., Barek, J., 2000. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados (NHPAs): uma revisão metodológica. *Química Nova*, 23(6):765-773.

Ramesh, A., Inyang, F., Hood, D.B., Knuckles, M.E., 2000. Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity in F-344 Rats Subchronically Exposed to Benzo(a)pyrene and Fluoranthene through Diet. *Biochem Molecular Toxicology*, 14(3)155-161

Ravichandran, N., Suresh, G., Ramesh, B., Siva, G.V., 2011. Fisetin, a novel flavonol attenuates benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Food and Chemical Toxicology*, 49:1141–1147.

Ritter, L., Solomon, K.R., Forget, J., Stemeroff, M., 1995. Persistent Organic Pollutants: An Assessment Report on DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Chlordane, Heptachlor, Hexachlorobenzene, Mirex, Toxaphene, Polychlorinated Biphenyls, Dioxins, and Furans. Canadian Network of Toxicology Centres and M. Stemeroff and C.O'Leary Deloitte and Touche Consulting Group.

Rodnight, R., Gonçalves, C.A., Wofchuk, S.T., Leal, R., 1997. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res*, 30(3): 325-338.

Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J.H., Arolt, V. 2003. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech*, 15;60(6):614-32.

Saunders, C.R., Shockley, D.C., Knuckles, M.E., 2001. Behavioral effects induced by acute exposure to benzo[a]pyrene in F-344 rats. *Neurotoxicol Res*, 3:557–79.

Saunders, C.R., Ramesh, A., Shockley, D.C., 2002. Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo(a)pyrene. *Toxicol. Lett.* 129, 33–45.

- Saunders, C.R., Das, S.K., Ramesh, A., Shockley, D.C., Mukherjee, S., 2006. Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *J Appl Toxicol*; 26:427–438.
- Schmidt, J.V., Bradfield, C.A., 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12:55-89.
- Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Ishikawa, T., 2000. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:779–782.
- Simko, P., 2002. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoking flavoring food additives. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*, 25, 770(1-2): 3-18.
- Song MK, Kim YJ, Song M, Choi HS, Park YK, Ryu JC (2011) Polycyclic aromatic hydrocarbons induce migration in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) through reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signal transduction. *Cancer Sci*, 102(9):1636-44.
- Spencer, P., 1992. Are human neurodegenerative disorders linked to environmental chemicals with excitotoxic properties? *Ann. NY Acad. Sci*; 648:154–160.
- Squire, L.R., Zola-Morgan, J.T., and Clark, R.E. Recognition memory and the medial temporal lobe: A new perspective. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 872-883, 2007.
- Sweatt, J.D., 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current Opinion in Neurobiology* 14:1–7.
- The Merck Index, 1989. 11a ed. Rahway: Merck & CO Inc.
- Tilson, H., 2000. Neurotoxicity risk assessment guidelines: developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology* 21:189–194.
- Tripiier, M.F., Markovits, P., Papadopoulo, D., Toga, M., 1979. Normal and benzo(a)pyrene-transformed fetal mouse brain cells. II. Ultrastructural study. *Acta Neuropathol.* 47(3):205-11.

Tsuji, G., Takahara, M., Uchi, H., Takeuchi, S., Mitoma, C., Moroi, Y., Furue, M., 2011. An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Journal of Dermatological Science*, 62:42–49.

Uno, S., Dalton, T.P., Derkenne, S., Curran, C.P., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., 2004. Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol Pharmacol*, 65:1225–1237.

Uno, S., Dalton, T.P., Dragin, N., Curran, C.P., Derkenne, S., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Gonzalez, F.J., Nebert, D.W., 2006. Oral benzo[a]pyrene in Cyp1 knockout mouse lines: CYP1A1 important in detoxication, CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate. *Mol Pharmacol* 69:1103–1114.

Van Eldik, L.J., Wainwright, M.S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*, 21:97–108.

Xia, Y., Cheng, S., He, J., Liu, X., Tang, Y., Yuan, H., He, L., Lu, T., Tu, B., Wang, Y., 2011. Effects of subchronic exposure to benzo[a]pyrene (B[a]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague–Dawley rat. *NeuroToxicology* 32, 188–198.

Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*, 206: 73–93.

Yan, T., Chengzhi, C., Haiyan, Y., Baijie, T., 2010. Distribution of benzo[a]pyrene in discrete regions of rat brain tissue using light microscopic autoradiography and gamma counting. *Toxicological & Environmental Chemistry* 92(7):1309 – 1317

Wang, X.K., Zhang, H.L., Meng, F.H., Chang, M., Wang, Y.Z., Jin, T., Mix, E., Zhu, J., 2012. Elevated levels of S100B, tau and pNFH in cerebrospinal fluid are correlated with subtypes of Guillain-Barré syndrome. *Neurol Sci*. DOI: 10.1007/s10072-012-1092-z

Wattenberg, L.W., Leong, J.L., 1970. Inhibition of the carcinogenic action of benzo(a)pyrene by flavones. *Cancer Research*, 30: 1922–1925.

Wood, A.W., Levin, W., et al., 1979. Biological Activity of Benzo[e]pyrene an assessment based on mutagenic activities and metabolic profiles of the polycyclic hydrocarbon and derivatives. *The Jour of Biol Chemis*, 254(11):4408-4415.

Wormley, D.D., Ramesh, A., Hood, D.B., 2004. Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity, and behavior. *Toxic and Appl Pharmacol*, 197:49-65.