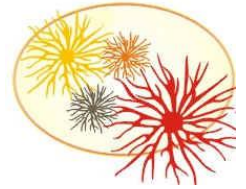




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



**Fenótipo MXR na anêmona do mar *Bunodosoma cangicum*: mecanismo de efluxo de cobre e influência da temperatura e salinidade**

**MSc. Vanessa Abelaira dos Anjos**

**Orientadora: Prof. Dra. Marta Marques de Souza**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Juliana Zomer Sandrini**

Tese defendida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Rio Grande, 2017

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos”

Isaac Newton

## AGRADECIMENTOS

Crescer na vida, pessoal e profissionalmente, não é fácil e isso só é possível com a ajuda de muitas pessoas. Considero essa parte da minha tese muito importante, pois é o espaço que tenho para tornar público o meu MUITO OBRIGADA a todos que me fizeram crescer.

Primeiro agradeço a Deus e ao meu anjo da guarda, certamente a fé de que temos alguém sempre cuidando de nós e nos guiando torna a caminhada mais segura.

Logo após preciso agradecer minha família. Não poderia ter pai e mãe melhores no mundo, e sou eternamente grata por ter sido filha de vocês. Concluir essa etapa longe de vocês foi complicado, mas sempre tenho certeza do apoio incondicional de vocês em todas as decisões que tomo. Amo muito vocês, tenho imensa saudade e não sei nenhuma palavra melhor para definir o que sinto exceto gratidão. Muito obrigada!

Agradeço também ao meu irmão Junior, sei que apesar de tu não ficar falando muito tu torces por mim em todos os momentos. Obrigada também por todas as dúvidas sanadas no quesito 'língua inglesa', tua ajuda é sempre fundamental. Agradeço também meu dindo Oscar, desejo um dia ser tão boa quanto tu achas que sou.

Junto a família, preciso agradecer ao meu amor, David. Quem diria que aquele que surgiu como um amigo no Carnaval ia mudar totalmente meus planos de vida. Obrigada por me apoiar, acreditar em mim, aguentar minhas crises e angústias. Tivemos que traçar uma nova trajetória de vida, para que conseguíssemos seguir em frente lado a lado, e tenho certeza que fizemos a escolha certa. Quero também deixar meu agradecimento a segunda família que me proporcionastes, pois sei que sou tratada como uma filha e, como tal, recebo o incentivo e torcida que só uma família é capaz de propiciar.

Meu próximo agradecimento é a Marta, minha orientadora há 6 anos. Uma caminhada longa, mas que me levou a crescer, tanto profissional quanto pessoalmente. Agradeço imensamente as pessoas que me sugeriram que tu fosses minha orientadora quando caí de paraquedas no ICB. Todo esse tempo depois, não teve um dia sequer que tivesse dúvida quanto à escolha de quem deveria conduzir meus passos. Obrigada por todo conhecimento passado, paciência, conversas e puxões de orelha. Agradeço também a Juliana (Ju), por ter sido minha co-orientadora. Apesar de não termos conseguido realizar a parte de biologia molecular como almejamos no início, tenho certeza que todas as tuas considerações sobre os trabalhos foram valiosas, e certamente a minha qualificação teria sido muito mais difícil sem tua ajuda.

Agradeço também à banca examinadora, professores Adalto Bianchini, Ana Paula Votto, Marcos Pessati e Samantha Martins por terem aceito meu convite e virem enriquecer meu trabalho com suas contribuições.

Agora preciso agradecer aos meus amigos, pois como diz a frase “quem anda sozinho pode até ir mais rápido, mas quem anda acompanhado certamente vai mais longe”. Àqueles que a vida me trouxe, Camila, Carol, Clarissa, Ester, Evelise, Flúvia, Karine, Laura, Paola, Alemão (Vinícius), Filipe, Gabriel, Lucas, Matheus, muito obrigada por estarem perto em todas as ocasiões (mesmo que não fisicamente)! Comemorar cada passo foi fundamental para seguir adiante, e tenho certeza que vamos muito mais além juntos. Aos amigos que a FURG me deu, obrigada por todas as discussões, risadas, chimarrão, comidas e fofocas. A sala 3 me proporcionou diversas amizades, mas alguns eu preciso destacar pois certamente serão amigos que levarei para o resto da vida, como as Robertas (Klein e Socoowski), Flávio (eternamente sala 3), Ana Kalb, Danusa, Kamila, Laura, Michele, Patty, Shana. Agradeço também às amigas do grupo de pesquisa, principalmente a Isadora, que muitas vezes pensei que era minha “IC” e acabava pedindo ajuda. Saiba que todas essas vezes foram fundamentais para a conclusão deste trabalho, além disso, sempre achei uma excelente companhia para trabalhar, e a Fernanda, que também teve grandes colaborações neste trabalho, ajudando nos experimentos *in vivo* e revisando o inglês “em cima do laço”. Aos amigos das outras salas, Amanda, Joseane, Juliano, Maiara, Silvana, obrigada por todos os momentos de descontração. Além deste, preciso de um agradecimento especial à Lygia, que me ajudou em diversos momentos durante o desenvolvimento da tese, sanando dúvidas (ou criando-as), corrigindo inglês, discutindo ciência ou simplesmente jogando conversa fora. Espero que a nossa parceria cresça e ainda possamos trabalhar, literalmente, juntas.

Agradeço também a professora Cláudia Martinez e ao laboratório de Ecofisiologia Animal da Universidade de Londrina pelas análises de acúmulo de cobre. E aos laboratórios de Cultura Celular, Citologia, Toxicologia e Determinações do Instituto de Ciências Biológicas da FURG pela disponibilização dos equipamentos e materiais necessários para a realização deste trabalho. Agradeço ao Programa de Pós-graduação de Ciências Fisiológicas – FAC pela oportunidade de engrandecimento pessoal e profissional. Agradeço também a CAPES/CNPq e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática (INCT-TA) pelo auxílio financeiro.

Enfim, minha chegada até aqui foi trilhada com o apoio de muitas pessoas. A todos que dedicaram um momento a conversar, discutir, torcer, apoiar, muito obrigada!

## **Apresentação do Formato da Tese**

O presente trabalho é constituído de uma *Introdução Geral*, que visa apresentar o tema a ser desenvolvido, tendo o propósito de fornecer embasamento teórico sobre o assunto. Em seguida são apresentados os *Objetivos Gerais e Específicos* da Tese. Os aspectos metodológicos, os resultados e a discussão dos mesmos estão divididos em dois trabalhos, um artigo publicado no periódico **Comparative Biochemistry and Physiology, part C** (fator de impacto/2016: 2,41) e um manuscrito a ser submetido ao periódico **Ecotoxicology and Environmental Safety** (fator de impacto/2016: 3,74). Em seguida, é apresentada uma *Discussão geral* com o intuito de integrar os resultados e discussões dos dois trabalhos, além de uma *Conclusão geral* e, por fim, são abordadas as *Perspectivas*.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	3
LISTA DE TABELAS .....	4
RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
INTRODUÇÃO GERAL .....	7
Biomarcadores:.....	7
Resistência a Múltiplos Xenobióticos – MXR:.....	9
Objetivo geral: .....	22
Objetivos específicos: .....	22
Artigo .....	24
Manuscrito .....	31
ABSTRACT .....	32
HIGHLIGHTS .....	32
1. INTRODUCTION .....	32
2. MATERIALS AND METHODS: .....	34
2.1. Collection and maintenance of anemones:.....	34
2.2. In vivo exposures: .....	35
2.2.1. Experimental conditions: .....	35
2.2.2. MXR analysis: .....	35
2.2.3. Tissue water content:.....	36
2.3. In vitro exposures: .....	36
2.3.1. Primary cell culture.....	36
2.3.2. Experimental conditions: .....	37
2.3.3. MXR analysis: .....	37
2.3.4. Cytotoxicity: .....	38
2.3.5. Cellular volume: .....	38
2.4. Statistical analysis: .....	38
3. RESULTS AND DISCUSSION .....	39
3.1. Temperature effects in MXR activity.....	39
3.2. Salinity effects on MXR activity .....	41
3.3. In vivo x In vitro exposures.....	45

3.4. Temperature x copper in MXR activity .....	46
3.5. Salinity x copper in MXR activity .....	49
4. CONCLUSION.....	51
ACKNOWLEDGEMENTS .....	51
REFERENCES .....	52
DISCUSSÃO GERAL.....	56
CONCLUSÃO GERAL.....	65
PERSPECTIVAS .....	66

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação da relação entre um estresse ambiental, detectabilidade da resposta e relevância ecológica. Adaptado de Moore e colaboradores (2004). .....7
- Figura 2: Estrutura de uma proteína ABC, mostrando seus domínios transmembrana e domínios de ligação. Fonte: Jeong e colaboradores (2017). .....10
- Figura 3: Esquema de funcionamento do efluxo de xenobióticos mediado por proteínas ABC com fenótipo MXR. À direita, as proteínas trabalham normalmente. À esquerda, as proteínas foram inibidas: (a) por inibição de ATPase; (b) por bloqueio do sítio de ligação; (c) por competição. Modificado de Jeong e colaboradores (2017). .....12
- Figura 4: Anêmona-do-mar *Bunodosoma cangicum* em aquário no biotério aquático da Universidade Federal de Rio Grande. Fonte: arquivo pessoal. ....21
- Figura 5: Hidratação das anêmonas do mar *Bunodosoma cangicum*. Painel A: Percentual de água da exposição in vivo a diferentes salinidades e concentrações de cobre. Painel B: Volume celular da exposição in vitro a diferentes salinidades e concentrações de cobre. 61
- Figura 6: Resumo gráfico da atividade MXR obtida nos diferentes experimentos realizados na presente tese, demonstrando que as proteínas ABC são uma via de efluxo de cobre e como os fatores abióticos de temperatura e salinidade agem sobre a atividade proteica. 64



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Referências bibliográficas que avaliaram atividade, expressão proteica e/ou expressão proteica de transportadores ABC na última década.....	14
---	----

## RESUMO

O ambiente aquático é passível de sofrer poluição, o que pode vir a interferir na saúde dos organismos que vivem neste ambiente. A utilização de biomarcadores é interessante, uma vez que eles mostram os efeitos biológicos que um poluente pode causar antes de afetar níveis maiores de organização. O fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MXR) é conferido às células pela família de proteínas transportadoras ABC, que fazem o efluxo de agentes tóxicos e alguns metabólitos, sendo utilizado como um biomarcador de contaminação ambiental. Assim, o presente estudo objetivou caracterizar a atividade MXR em células de anêmonas *Bunodosoma cangicum* expostas ao cobre e também buscou conhecer como essa atividade se altera *in vivo* e *in vitro* diante de variações de temperatura e salinidade, além da exposição ao metal. Foi observado que a atividade MXR é importante para a efluxo do cobre, uma vez que quando a atividade das proteínas é inibida, há um aumento na acumulação do metal bem como um aumento na morte celular. Além disso, observou-se que a salinidade possui um efeito menor do que a temperatura sobre a atividade dessas proteínas, onde variações de salinidade não causaram alterações na atividade em relação ao controle, mesmo na presença do metal. Já a temperatura possui um maior efeito sobre a atividade MXR, onde temperaturas mais baixas (15°C) inibiram a atividade, entretanto 20 e 25°C não foram diferentes entre si. Já a associação das variações de temperatura com a presença do metal gerou novas respostas. Apesar da atividade MXR ter sido menos sensível às variações de salinidade, foram nessas condições que se evidenciou as diferenças existentes entre as respostas obtidas *in vivo* e *in vitro*. O modelo *in vivo* mostrou que a condição hipersalina é estressante para os animais, que produziram muco para reduzir o contato com o ambiente, já no modelo *in vitro* viu-se que essa mesma condição leva as células à morte. Portanto, o presente estudo demonstra a importância da atividade MXR como uma via para o efluxo de cobre e também alerta para a necessidade de monitoramento das condições abióticas no uso dessas proteínas como biomarcador ambiental, com especial destaque para a temperatura.

Palavras-chave: biomarcador, fatores abióticos, metal, resistência a múltiplas drogas.

## ABSTRACT

The aquatic environment can suffer pollution, which could interfere with the organisms' health that live in this environment. The use of biomarkers is interesting since they show the biological effects that a pollutant can cause before it affects higher levels of organization. The phenotype of multixenobiotic resistance (MXR) belongs to the ABC transporters protein family in the cells, which makes the extrusion of xenobiotics and some metabolites, being used as a biomarker of environmental contamination. The present study aimed to characterize the MXR activity in sea anemones *Bunodosoma cangicum* cells exposed to copper and also sought to know how this activity changes *in vivo* and *in vitro* under variations in temperature and salinity, as well as exposure to the metal. It was observed that the MXR activity is important for the efflux because when the activity of the protein is inhibited, there is an increase in metal bioaccumulation as well as an increase in cell death. Moreover, we observe that salinity has a smaller effect than the temperature on MXR activity, where variations in salinity did not cause changes in activity, relative to the control, even in the presence of metal. Conversely, the temperature had a great effect on the MXR activity, where lower temperatures (15° C) inhibited activity, however, 20 and 25° C were not different among themselves. Meanwhile, the association of temperature variations and the metal presence generated new responses. Despite the MXR activity have been less sensitive to salinity variations, it was in these conditions that the differences between the responses obtained *in vivo* and *in vitro* were evident. The *in vivo* model showed that the hypersaline condition is stressful for the animals, which produced mucus to reduce contact with the environment, while in the *in vitro* model this same condition takes the cells to death. Therefore, the present study shows the importance of the MXR activity as one way for copper extrusion and also alerts to the need for monitoring abiotic conditions along with the use of these proteins as a biomarker, particularly environmental temperature.

Keywords: abiotic factors, biomarker, metal, multidrug resistance.

## INTRODUÇÃO GERAL

O ambiente aquático é passível de sofrer poluição por substâncias, de origem natural ou antrópica, que podem interferir na condição de saúde dos organismos que ali vivem. Embora haja uma grande preocupação sobre as alterações fisiológicas que estes estressores possam causar à população/comunidade/ecossistema, estes níveis ecológicos são geralmente muito complexos de serem estudados. Além disso, as respostas observadas nestes níveis já se encontram muito longe dos aspectos causais (Moore *et al.*, 2004), como demonstra a figura 1. Por isso, o desenvolvimento de ferramentas que consigam detectar rapidamente mudanças no ambiente e que consigam prever as consequências de determinado estresse ambiental é importante.

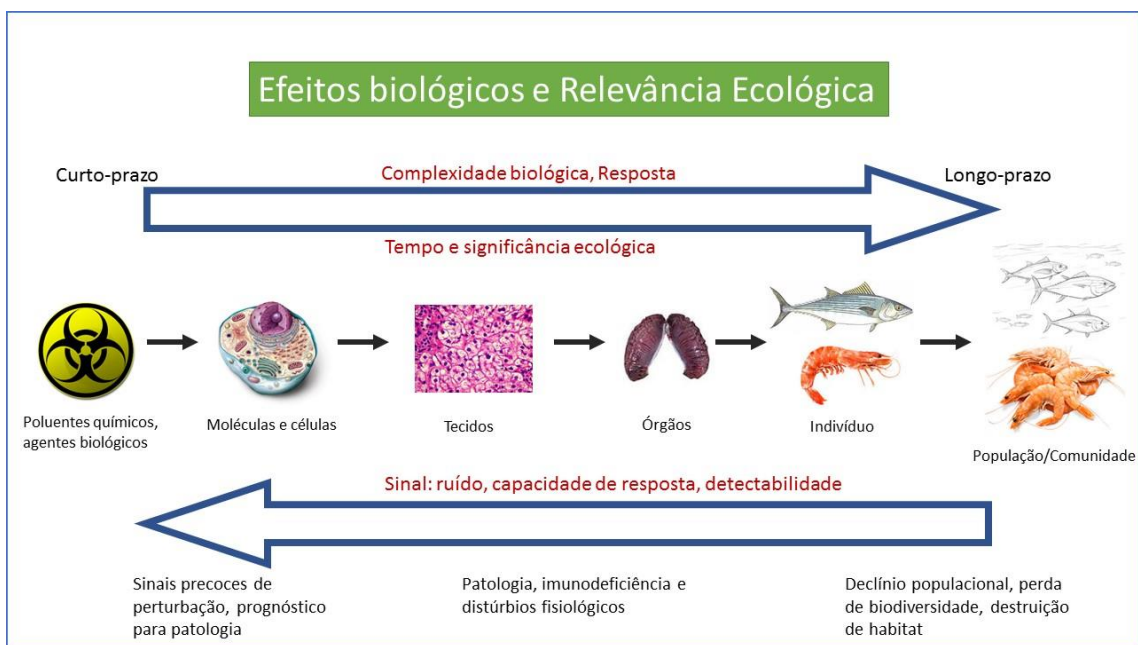


Figura 1: Representação da relação entre um estresse ambiental, detectabilidade da resposta e relevância ecológica. Adaptado de Moore e colaboradores (2004).

### Biomarcadores:

Uma única definição do termo biomarcador é difícil de se encontrar na literatura, dessa forma utilizaremos aqui o conceito proposto por Shugart e colaboradores (1992) que diz que “um biomarcador é uma variação induzida por

xenobiótico\* em células ou componentes bioquímicos, processos, estruturas ou funções e que são mensuráveis em sistemas biológicos ou amostras”. Portanto, alterações que os estressores causam em níveis bioquímicos, fisiológicos, histológicos, morfológicos ou comportamentais podem ser considerados biomarcadores.

Essas alterações podem ser consideradas “sinais de aviso precoce”, sendo importantes ferramentas para avaliar a qualidade do ambiente em que o organismo se encontra, uma vez que seu uso tem capacidade de antecipar mudanças em níveis biológicos maiores de organização, como populações, comunidades e ecossistemas. Dessa forma, biomarcadores podem ser definidos também como indicadores de curto-prazo para efeitos biológicos de longo-prazo (Cajaraville *et al.*, 2000).

Biomarcadores são comumente divididos em biomarcadores de exposição e biomarcadores de efeito, apesar de diversas outras classificações poderem ser encontradas na literatura. Conforme classificação de Walker e colaboradores (2001), os primeiros são aqueles que indicam que o organismo está exposto a algum agente tóxico, entretanto não fornece nenhum tipo de informação sobre o grau de toxicidade que essa exposição causa. Já o segundo demonstra o efeito adverso que tal substância está causando no organismo.

As mudanças que ocorrem na saúde do animal diante de um aumento na exposição aos agentes tóxicos podem ser vistas como uma curva que vai desde a saúde, passando por mudanças reversíveis a irreversíveis que podem levar à morte. Os principais pontos desta transição são: quando o organismo sofre o primeiro estresse (foge de sua homeostase, entretanto ainda é capaz de compensar este estresse); quando o organismo não é mais capaz de compensar, mas as mudanças ainda são reversíveis e a remoção do estresse permite a recuperação do organismo; e por último, quando as mudanças são irreversíveis e a morte sucede.

\* Xenobiótico: originário do grego, onde *xenos* significa estranho, ou seja, são substâncias estranhas a um organismo.

As mudanças que podem ocorrer nos organismos podem ser de dois tipos, aquelas que servem para proteger contra o perigo dos agentes tóxicos e aquelas que não protegem, apenas indicam que o dano que o organismo está sofrendo (por exemplo, danos de DNA, lipoperoxidação, inibição da acetilcolinesterase, entre outros). As respostas protetivas trabalham por mecanismos que visam proteger as células das substâncias prejudiciais, através de interações que visem limitar a biodisponibilidade ou então facilitando a excreção destas (Walker *et al.*, 2001).

Dentre os biomarcadores de exposição que possuem uma resposta protetiva temos o fenótipo de resistência a múltiplos xenobióticos (MXR), também chamado de biomarcador de defesa celular (Kurelec *et al.*, 2000).

#### Resistência a Múltiplos Xenobióticos – MXR:

O fenótipo de resistência a múltiplos xenobióticos (MXR) é conferido às células pela atividade de proteínas de uma superfamília de transportadores, a família ABC (*ATP-binding cassette*) (Bard 2000, Annilo *et al.*, 2006, Jeong *et al.*, 2017). Todas estas proteínas possuem um domínio de ligação ao ATP (NBD - *nucleotide binding domain*) e um domínio transmembrana (TM – *transmembrane domain*) ou dois NBDs e dois TMs (figura 3). Os domínios transmembrana são localizados no citoplasma, atravessando a membrana seis vezes e são altamente conservados ao longo do reino animal. Eles são altamente hidrofóbicos e as seis hélices que abrangem toda a região da membrana formam a passagem para o substrato (Jeong *et al.*, 2017). NBDs são caracterizados por curtas sequências de aminoácidos em sua estrutura primária (chamados de *Walker A*, *Walker B* e *motif C* que é a sequência de assinatura ABC, que as diferencia das outras ATPases) que são responsáveis por ligar a molécula de ATP e realizar sua hidrólise, gerando assim energia para o transporte das substâncias contra o gradiente de concentração (Schneider e Hunke, 1998; Hollenstein *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2017).

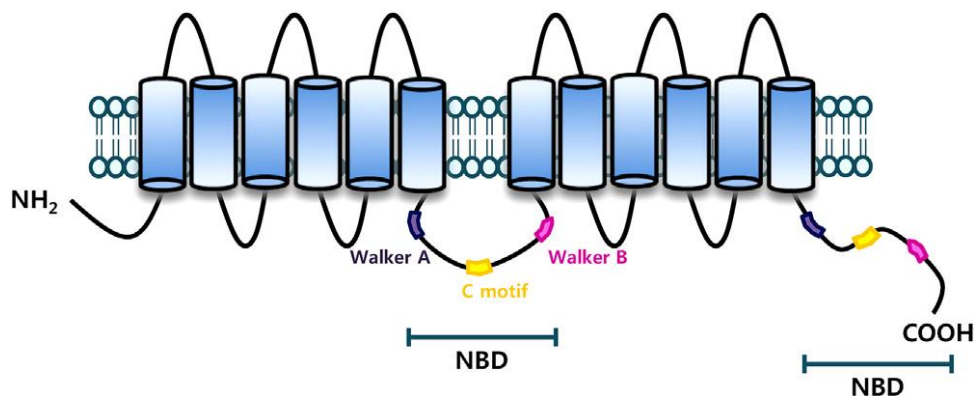


Figura 2: Estrutura de uma proteína ABC, mostrando seus domínios transmembrana e domínios de ligação ao ATP. Fonte: Jeong e colaboradores (2017).

Dentro da família ABC existem diversas subfamílias, nomeadas de A a H, mas nem todas estão relacionadas ao fenótipo de resistência a múltiplos xenobióticos. Em organismos aquáticos, MXR é conferido principalmente por proteínas da subfamília B, através da glicoproteína-P (Pgp, MDR1, ABCB); da subfamília C, através de transportadores de resistência a múltiplas drogas (MRP, ABCC) e da subfamília G, através da proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP, ABCG) (Zucchi et al., 2010; Jeong et al., 2017). As isoformas presentes na família ABCB podem ser divididas em dois grupos, um de transportadores completos, com dois NBDs e dois TMs, e outro grupo contendo apenas um NBD e um TM. As isoformas ABCB1, 4, 5 e 11 pertencem ao grupo dos transportadores completos, enquanto que as isoformas ABCB2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10 pertencem ao segundo grupo, necessitando, portanto, estarem aos pares para funcionarem (Anillo et al., 2006). Já as isoformas de ABCC possuem a estrutura completa dos transportadores, com dois NBDs e dois TMs, entretanto, as isoformas ABCC4, 5, 8 e 9 são chamadas de “*short MRPs*”, enquanto isoformas ABCC1, 2, 3, 6 e 7 são chamadas de “*long MRPs*” pois possuem um domínio transmembrana NH<sub>2</sub>-proximal extra, ou seja, possuem 3 TMs (Zhang et al., 2015). Por fim, a subfamília ABCG possui menos isoformas descritas na literatura, sendo elas sempre encontradas com apenas um NBD e um TM, necessitando, portanto, apresentarem-se aos pares. ABCG é a subfamília com o menor espectro de substratos

transportados entre as proteínas ABC, estando envolvida com o transporte de esterol e outros substratos não-conjugados (Anillo et al., 2006; Jeong et al., 2017).

Devido à capacidade das proteínas ABC de realizarem o efluxo de uma variada gama de substâncias, inclusive contaminantes ambientais, elas são consideradas um importante mecanismo de defesa celular, contribuindo para que os animais tenham diversos graus de resistência quando expostos a algum agente tóxico (Kurelec, 1995; Bard, 2000). Esse fenótipo foi primeiramente identificado por Juliano e Ling (1976) em células modificadas de câncer de ovário em hamsters chineses e eles nomearam estas células, que possuíam proteínas de membrana que podiam fazer o efluxo de químicos, de “resistente a múltiplas drogas” (MDR). Hoje sabemos que é essa resistência as drogas que confere às células tumorais a resistência contra os quimioterápicos.

Pelo fenótipo ser conferido por proteínas, três aspectos podem ser considerados para avaliar sua presença. Pode-se medir a atividade dessas proteínas, verificar/quantificar a quantidade de proteína na membrana celular ou ainda, verificar a expressão desses genes (Epel, 1998). Mas embora seja interessante avaliar estes três aspectos, normalmente são estudados apenas um ou dois pontos (Kingtong et al., 2007, Rocha e Souza, 2012, Della Torre et al., 2012; Della Torre et al., 2014), sendo que a atividade pode ser concebida como o principal parâmetro, pois é o resultado final do mecanismo.

A expressão proteica pode ser verificada por marcadores imunológicos, onde é utilizado um anticorpo que se liga a estas proteínas. Pelo fato das proteínas ABC serem altamente conservadas entre os organismos, comumente é utilizado o anticorpo monoclonal C219 (contra MDR1, ABCB1, Pgp), que apesar de ser derivado de mamífero é frequentemente utilizado até mesmo para invertebrados (Epel, 1998; Kingtong et al., 2007; Rocha e Souza, 2012). Já a análise gênica pode ser feita de maneira quantitativa ou semi-quantitativa pela reação em cadeia da polimerase reversa (qRT-PCR ou RT-PCR) ou pela avaliação da expressão de mRNA dos genes das proteínas ABC (Ferreira et al., 2014).

A atividade dessas proteínas ABC que geram o fenótipo MXR (a partir daqui chamada de atividade MXR, a fim de facilitar a compreensão) pode ser medida



através do acúmulo celular de substratos fluorescentes ou sobre o efluxo desses substratos. Dessa forma, no acúmulo é avaliada a quantidade de corante que foi acumulado no interior da célula/tecido/organismo, onde um maior acúmulo representa uma menor atividade e vice-versa. Já no efluxo, o processo é inverso, onde se avalia quanto de substrato foi colocado para fora da célula, avaliando-se a quantidade de corante no meio. Normalmente, os substratos fluorescentes mais utilizados são rodamina B, rodamina 123, calceína-AM (Kurelec et al. 2000, Sandrine e Marc, 2007; Campos et al., 2014; Rioult et al., 2014). Além disso, é possível realizar a inibição dessas proteínas através de inibidores (também chamados de quimiossensibilizantes/quimiossensibilizadores na literatura), levando a um maior acúmulo do substrato. Essas substâncias podem inibir a ação de transporte por 3 mecanismos: inibição de ATPase, bloqueio do sítio de ligação do ATP ou por competição (figura 4) (Jeong *et al.*, 2017).

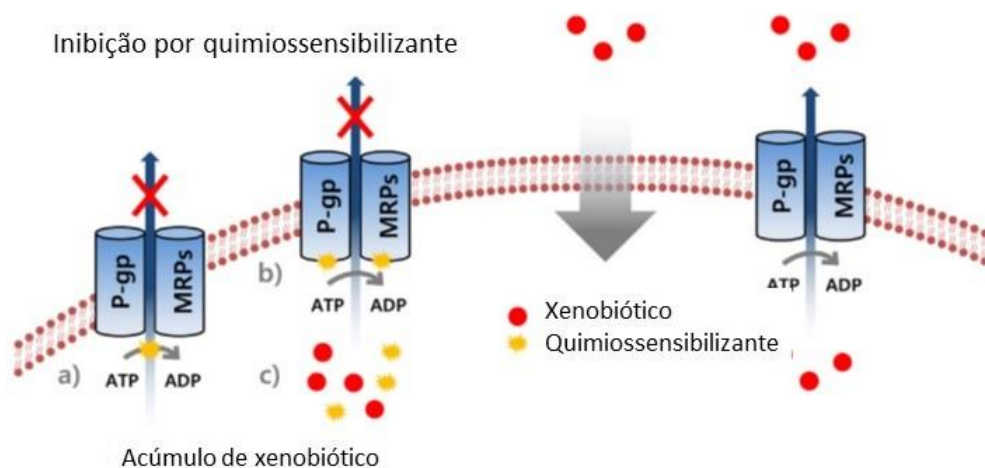


Figura 3: Esquema de funcionamento do efluxo de xenobióticos mediado por proteínas ABC com fenótipo MXR. À direita, as proteínas trabalham normalmente. À esquerda, as proteínas foram inibidas: (a) por inibição de ATPase; (b) por bloqueio do sítio de ligação; (c) por competição. Modificado de Jeong e colaboradores (2017).

Dessa forma, a atividade MXR em resposta a diferentes substratos, os quais podem ser poluentes ambientais, pode ser indiretamente medida através da adição do substrato fluorescente e do agente tóxico. Assim, observa-se se o transporte do

fluorescente irá ocorrer (em maior ou menor quantidade que no grupo controle), pois a presença do poluente pode alterar a atividade MXR, tanto aumentando-a quanto diminuindo-a.

Logo, agentes tóxicos que possam agir como quimiossensibilizantes (que diminuem a atividade MXR) merecem maior atenção quanto ao seu risco ambiental. Essas substâncias podem diminuir este mecanismo de defesa celular, favorecendo o acúmulo não só do próprio poluente como também de outras substâncias (até mesmo metabólitos celulares) que estavam saindo por esta via (Kurelec et al., 1995a, b). Portanto, a atividade MXR pode ser um ponto crucial na sensibilidade dos organismos frente à poluição (Smital et al., 2000).

Na última década, a literatura mostra que a maior parte dos trabalhos visam caracterizar a presença do fenótipo em diversos modelos animais (Sauerborn et al., 2010; Bošnjak et al., 2013; Bošnjak et al., 2014, Campos et al., 2014; Ferreira et al., 2014; Vehniäinen e Kukkonen, 2015); descobrir a partir de qual etapa do desenvolvimento surge a capacidade de defesa nos organismos (Faria et al., 2011; Kropf et al., 2016; Franzellitti et al., 2017); testar novas drogas com o objetivo de comprometer o efluxo de substâncias por essas bombas, a fim de descobrir novos tratamentos para o câncer (Tiwari et al., 2009; Choi e Yu, 2014; Zhang et al., 2015; Hasanabady e Kalalinia, 2016; Patel et al., 2017); e uma vasta gama de estudos com diversas substâncias a fim de descobrir como estas interferem na atividade, expressão proteica e expressão gênica dessas proteínas (Amé et al., 2009; Franzellitti et al., 2011; Huang et al., 2014; Bonnafé et al., 2015; Georgantzopoulou et al., 2016; Cunha et al., 2017). Estudos como os últimos citados geram um imenso leque de possibilidades a serem investigadas, pois um mesmo agente tóxico pode ter comportamentos diferentes dependendo da espécie e/ou concentração utilizada. Dessa forma, as substâncias vêm sendo estudados quanto ao seu potencial de ativar ou inibir a atividade MXR, conforme alguns exemplos listados na tabela abaixo:

Tabela 1. Referências bibliográficas que avaliaram atividade, expressão proteica e/ou expressão gênica de transportadores ABC na última década.

Referência	Ano	Animal	Exposição	Tipo de exposição	Atividade	Expressão proteica	Expressão gênica
Kingtong <i>et al.</i>	2007	<i>Saccostrea forskali</i> (molusco)	Tributiltin	<i>in vivo</i>	Inibiu e ativou (10µM)	Aumentou e diminuiu (150µg/L)	n.a.
Timofeyev <i>et al.</i>	2007	<i>Eulimnogammarus cyaneus</i> <i>Eulimnogammarus verrucosus</i> (crustáceos)	Matéria orgânica natural, cádmio	<i>in vivo</i>	Inibiu	n.a.	n.a.
Zucchi <i>et al.</i>	2010	<i>Trematomus bernacchii</i> (peixe)	Cádmio	<i>in vivo</i>	n.a.	Aumentou	Aumentou
Rocha e Souza	2011	<i>Corbicula fluminea</i> (molusco)	Chumbo	<i>in vivo e in vitro</i>	Inibiu <i>in vitro</i>	Aumentou <i>in vitro</i>	n.a.
Della Torre <i>et al.</i>	2012	<i>Linagem celular PHLC-1</i> (de peixe)	Cádmio, mercúrio, arsênio e cromo	<i>in vitro</i>	Inibiu	n.a.	Aumentou
Fernandez-Sanjuan <i>et al.</i>	2013	<i>Dreissena polymorpha</i> (molusco)	Químicos perfluorados (PFCs)	<i>in vivo</i>	Inibiu em 1 dia	n.a.	n.a.
Anjos <i>et al.</i>	2014	<i>Bunodosoma cangicum</i> (anêmona do mar)	Cobre	<i>in vitro</i>	Aumentou	n.a.	n.a.
Della Torre <i>et al.</i>	2014	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (molusco)	Cádmio	<i>in vivo e in vitro</i>	Aumentou ( <i>in vitro</i> )	n.a.	Aumentou ( <i>in vivo e in vitro</i> )
Ferreira <i>et al.</i>	2014	<i>Dicentrarchus labrax</i> (peixe)	Benzo(a)pireno (BaP)	<i>in vitro</i>	Inibiu	n.a.	Aumentou
Nornberg <i>et al.</i>	2014	<i>Linagem celular ZFL</i> (de peixe)	Metilparation	<i>in vitro</i>	Aumentou	n.a.	Não alterou
Oliveira <i>et al.</i>	2014	<i>Corbicula fluminea</i> (molusco)	Lixiviado de lixo doméstico	<i>in vivo</i>	Inibiu	n.a.	n.a.
Anjos <i>et al.</i>	2016	<i>Mesodesma mactroides</i> (molusco)	Cobre	<i>in vitro</i>	Inibiu	n.a.	n.a.
n.a. = não avaliado							

Como pode-se perceber, uma grande variedade de substâncias possui potencial de ser substrato para as proteínas ABC, como compostos orgânicos e metais. Aqui destaca-se o termo potencial uma vez que nestes trabalhos não foram avaliados se de fato estas substâncias estão sendo eliminadas por esta via, apenas estuda-se se há aumento ou diminuição da atividade/expressão proteica/expressão gênica. Dentre os metais, o cobre (Cu) é um dos mais relevantes contaminantes inorgânicos nas águas costeiras da região sul do Brasil (Costa e Wallner-Kersanach, 2013), principalmente em regiões portuárias mais movimentadas, como o Porto de Rio Grande (RS, Brasil), onde pode haver uma contribuição significativa do metal proveniente de tintas anti-incrustantes (Barbosa, 2006). Estudos recentes mostram que, de fato, esta região apresenta níveis de metais bastante elevados, principalmente de cobre, zinco e chumbo (Costa et al., 2016; Soroldoni et al., 2017). As concentrações de cobre foram as mais altas para todos os metais, variando de 4-80 µg/g de sedimento em área próxima à saída do porto, mas podendo chegar até a 768 µg/g em outras regiões do estuário da Lagoa dos Patos (Costa et al., 2016). Além disso, o cobre pode estar presente nos efluentes domésticos, de refinaria e industriais, chegando dessa forma até o ambiente aquático (Barbosa et al., 2012; Wallner-Kersanach et al., 2016).

O cobre é um elemento traço essencial que faz parte de diversas enzimas que são chaves no metabolismo dos animais, como por exemplo a citocromo c oxidase mitocondrial, crucial na respiração celular. Por conta disso, as células e os animais possuem mecanismos para captar, distribuir, detoxificar e eliminar que objetivam manter o cobre (e outros metais essenciais) dentro de níveis fisiológicos ou sub-tóxicos (Arciello et al., 2005; Grosell, 2012). A captação do cobre para as células é mediada por uma família de proteínas transportadoras de cobre, CTR (*copper transporters*), que ocorre sem gasto energético e é facilitado pela baixa concentração intracelular de Cu, uma vez que dentro da célula não existe a forma iônica livre disponível (estão sempre complexados a outras moléculas) (Balamurugan e Schaffner, 2006; Silva et al., 2014). Em mamíferos, CTR é considerada a principal forma de captação do metal através da dieta. Além desta proteína, transportadores de metais divalentes também podem ser potenciais vias de entrada do metal. A distribuição de cobre é realizada através de chaperonas específicas, que ligam o metal com alta afinidade e o entregam aos alvos específicos (La Fontaine e Mercer, 2007). Já as metalotioneínas constituem um grupo de proteínas com grande capacidade de ligar metais e têm função principal de agir como uma fonte de estocagem, deixando o metal não-biodisponível para reagir com outras moléculas, mas podendo ser utilizado caso haja necessidade (Balamurugan e Schaffner, 2006). Por fim, outra família de proteínas está envolvida no transporte de cobre, agindo tanto sobre a captação quanto sobre a eliminação do metal são as proteínas transportadoras de cobre, Cu-ATPases, com duas isoformas amplamente relacionadas a este transporte, ATP7A e ATP7B (Lutsenko et al., 2007; Silva et al., 2014). Elas medeiam a translocação do cobre através da membrana com a energia derivada da hidrólise do ATP, tendo um papel valioso na homeostase do metal, uma vez que agem tanto na captação quanto na eliminação do cobre, uma vez que podem realizar o transporte nos dois sentidos da membrana (La Fontaine e Mercer, 2007; Lutsenko et al., 2007).

Entretanto, mesmo com todos esses mecanismos para buscar a homeostase do metal, algumas vezes ela pode ser rompida, levando o cobre a níveis tóxicos. Devido ao seu potencial redox, ou seja, a capacidade de doar e receber elétrons,

quando ele não se encontra devidamente estabilizado, ou seja, estando biodisponível para reagir com outros elementos, pode danificar as células, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) e levando ao estresse oxidativo, o que pode gerar modificações em proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, afetando as estruturas e funções destes. Além disso, o próprio cobre pode ligar-se diretamente a resíduos de aminoácidos (histidina, cisteína e metionina), inativando enzimas ou alterando a estrutura conformacional proteica (Grosell, 2012; Tamás et al., 2014). Um outro alvo da toxicidade do cobre está relacionado a proteínas que fazem o balanço osmorregulatório dos animais, onde a homeostase do sódio parece ser prejudicada uma vez que o metal pode inibir a atividade da Na-K ATPase, bem como prejudicar a absorção de cloreto e também inibir a atividade da anidrase carbônica (Grosell et al., 2002; Bianchini et al., 2004), além disso o cobre pode ser transportado por canais de sódio presentes na membrana celular, diminuindo assim a captação de  $\text{Na}^+$  (que leva a um desbalanço iônico) bem como aumentando a acumulação do metal (Grosell e Wood, 2002; Alsop e Wood, 2011).

Quanto à interação do cobre com as proteínas ABC, alguns trabalhos já mostraram que esta pode ser uma forma de detoxificação celular. Apesar do cobre ser um metal essencial e com isso não ser classificado como um xenobiótico, ele é muitas vezes tratado como tal devido ao potencial de ser substrato para as proteínas ABC com o fenótipo de resistência a múltiplos xenobióticos. Um dos primeiros trabalhos que mostram que o cobre altera a atividade das proteínas ABC é o de Achard e colaboradores (2004), onde os autores mostraram uma indução da expressão proteica em células de *Corbicula fluminea* exposto a 40  $\mu\text{g Cu/L}$  durante 3 dias. Anjos e colaboradores (2014) encontraram uma indução na atividade MXR em células de anêmonas expostas a 7,8  $\mu\text{g Cu/L}$  por 24 horas. Mas foi somente em 2014 que ficou evidenciado que de fato o cobre é um substrato para estas proteínas e que quando estas encontram-se inibidas aumenta a bioacumulação do metal. Este experimento foi realizado por Jeong e colaboradores, que ao exporem o copépode *Tigriopus japonicus* por 24h ao cobre e a um inibidor de proteínas ABC,

observaram que a quantidade de metal no corpo do organismo foi maior naqueles que tiveram a atividade MXR inibida.

Entretanto, parece que atividade MXR não está apenas relacionada à presença de agentes tóxicos. Minier e colaboradores (2000) encontraram uma forte correlação entre a temperatura e a quantidade de proteínas ABC em *Mytillus galloprovincialis*, assim como Keppler e Ringwood (2001) também encontraram relação entre aumento de temperatura e maiores quantidades de glicoproteína-P nas brânquias de ostras *Crassostrea virginica*. Eufemia e Epel (2000) observaram um aumento da atividade e também na quantidade de proteínas em brânquias de *Mytillus californianus* expostos a temperaturas mais elevadas (12, 20 e 25°C). Esses autores também encontraram uma relação entre um aumento da atividade MXR quando há aumento na atividade de proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins* - Hsp), que já são conhecidas por serem induzidas sobre uma variedade de estresses químicos e físicos, principalmente a alta temperatura (Parsell e Lindquist, 1994), sugerindo que a indução das proteínas ABC, assim como Hsp, parece ser uma resposta generalizada ao estresse e não apenas a presença de contaminação. Já Luedeking e Koehler (2004) avaliaram a expressão gênica de proteínas ABC (ABCB e ABCC) no mexilhão *Mytillus edulis* sob variações de temperatura, salinidade e disponibilidade de oxigênio, e viram que ABCC não foi alterada por variações ambientais, entretanto a expressão de ABCB sofreu interferência, diminuindo a expressão gênica em baixa salinidade, aumentando em hipóxia e não sofrendo alteração com a mudança de temperatura (vale ressaltar que não houve choque térmico, a temperatura foi alterada gradativamente, enquanto que a disponibilidade de oxigênio e a salinidade foram mudadas repentinamente e mantidas por 24h). Um trabalho prévio do nosso grupo avaliou a atividade MXR em células branquiais de *Amarilladesma mactroides* sob choque hiposmótico (também de forma abrupta, mantido por 5h) e na presença do cobre (Anjos et al., 2016). Foi observado que a baixa salinidade aumentou a atividade MXR, independentemente da presença do metal. Este resultado corrobora a ideia proposta por Marin e colaboradores (2005), que propuseram que as proteínas ABC estariam funcionalmente relacionadas a canais de cloreto VSOR (canais de cloreto

de retificação sensíveis ao volume), e que as correntes de cloreto ativadas pelo inchaço do choque osmótico levariam a um aumento na atividade MXR.

Apesar de haver alguns estudos correlacionando proteínas ABC e fatores abióticos, ainda são necessários mais estudos para melhor compreender se estes fatores de fato interferem nestas proteínas, como isto ocorre e como respondem quando associados a agentes tóxicos. Esse conhecimento é necessário principalmente porque o fenótipo de MXR é utilizado como um biomarcador, e para que seja considerado eficiente é necessário conhecer a forma como estas variáveis ambientais interferem em sua resposta. Conforme sugerido nos trabalhos de Minier e colaboradores (2000), e Eufemia e Epel (2000), é necessário que os fatores ambientais sejam cuidadosamente monitorados de maneira que possa ser distinguível a resposta das flutuações naturais do ambiente daquelas causadas pelos agentes tóxicos. Para isso, é necessário conhecer como elas ocorrem separadamente e quando associadas.

Pelo fenótipo MXR ser conferido por uma família de proteínas (ABC), é bastante provável que os fatores abióticos tenham uma interferência direta sobre a atividade destas. Já é sabido na literatura que a temperatura influencia diretamente aspectos metabólicos, principalmente em animais ectotérmicos, porque estes têm sua temperatura corporal variando conforme as variações de temperatura ambientais, resultando em alterações nas taxas de reações fisiológicas e bioquímicas, além de atuar na estabilidade das moléculas, com especial destaque àquelas presentes na membrana celular, que podem alterar sua fluidez (Sokolova e Lannig, 2008). Na revisão de Sokolova e Lannig (2008), os autores não apenas consideram o efeito que a temperatura possui sobre o metabolismo dos animais como retratam o efeito que a combinação de temperatura e agentes tóxicos, com destaque aos metais, podem ter no metabolismo dos animais. De maneira geral, o aumento da temperatura aumenta a toxicidade dos metais, por um aumento na taxa de captação, um aumento na taxa metabólica, ou por um aumento na permeabilidade da membrana. Ou seja, além da temperatura em si poder influenciar a atividade MXR, é possível que a combinação com a exposição ao agente tóxico gere ainda outro tipo de resposta devido a estas alterações

fisiológicas. Assim como a temperatura, a salinidade pode causar alterações metabólicas em organismos aquáticos, a fim de que estes mantenham o balanço iônico e osmótico (Grosell et al., 2007). Estas mudanças podem vir influenciar a atividade das proteínas ABC, como já foi citado acima, conforme os trabalhos de Marin *et al.* (2005) e Anjos *et al.* (2016). Adicionalmente, Honorato e colaboradores (2017) viram que a variação de salinidade influencia não apenas a atividade MXR, mas também a produção de espécies reativas de oxigênio, bem como a taxa de respiração mitocondrial. Além disso, a salinidade tem ligação direta com o efeito tóxico que os metais podem ter no meio aquático, onde normalmente postula-se que uma alta salinidade aumenta a complexação dos metais diminuindo assim sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua toxicidade (Grosell et al., 2007; Grosell, 2012). Dessa forma, nota-se que além da salinidade em si poder influenciar a atividade MXR, quando esta associa-se a um agente tóxico pode passar a apresentar um novo padrão de resposta.

Como pode ser percebido na Tabela 1, a maior parte dos trabalhos avalia a resposta *in vivo* ou *in vitro* das proteínas ABC, sendo poucos realizados com as duas abordagens. Enquanto estudos *in vitro* são menos complexos que aqueles que usam o animal inteiro, esses modelos possuem características que são valiosas, como a facilidade de entender estruturas, identificar mecanismos e vias de sinalização (Robinson et al., 2011; Wiesinger et al., 2012). Além disso, apresentam como vantagens a facilidade de processamento, menor custo, geralmente um menor número de animais utilizados ou às vezes nem utilizados (culturas celulares estabelecidas), respostas mais rápidas e menor produção de resíduos. Alguns destes aspectos afinam-se com a doutrina dos 3 R (*replace, reduce, refine*), que visa substituir, reduzir e refinar a experimentação em animais (Garle et al., 1994; Evans et al., 2001; Bowen et al., 2013). Entretanto, experimentos *in vivo* permitem a obtenção de respostas mais complexas e dinâmicas, permitindo conhecer como o organismo, como um todo, responde aos parâmetros avaliados (Robinson et al., 2011). Quando o modelo *in vitro* apresenta respostas similares ao modelo *in vivo* pode-se utilizar a abordagem celular no lugar da experimentação animal, em prol dos 3 R, mas para isso é necessário, inicialmente, conhecer o



padrão de respostas de ambos os modelos. Entretanto, se mesmo após conhecer os dois modelos, os padrões de resposta não forem similares, a importância de cada metodologia não é descartada. Como já mencionado, os resultados *in vitro* possuem um grande poder de explicar mecanismos, sejam eles fisiológicos ou de toxicidade, enquanto que *in vivo* obtém-se respostas orgânicas frente à condição de estresse.

O modelo animal utilizado nesta tese foi a anêmona-do-mar *Bunodosoma cangicum* Corrêa 1964 (figura 5), pertencente ao Filo Cnidaria, Classe Anthozoa, Ordem Actiniaria. Estes animais apresentam um sistema nervoso em forma de rede simples, sem estruturas individualizadas para trocas gasosas, excreção ou circulação, possuindo poucos tipos celulares (Brusca e Brusca, 2007). As anêmonas são osmoconformadoras, ou seja, apresentam osmolalidade do fluido corporal em conformidade com a osmolalidade do meio externo. *B. cangicum* é uma espécie bentônica, de baixa mobilidade, que habita regiões intermarés das regiões Sul e Sudeste do Brasil, geralmente encontram-se aderidas a rochas ou em fendas arenosas (Melo e Amaral, 2005). A utilização de cnidários em estudos ecotoxicológicos é pouco explorado na literatura, todavia, nos últimos anos o uso de corais vem tendo destaque devido ao branqueamento que estes organismos estão sofrendo como um dos efeitos do aquecimento global (Biscéré et al., 2017; Fonseca et al., 2017; Marangoni et al., 2017). Entretanto, o uso de anêmonas ainda permanece escasso.



Figura 4: Anêmona-do-mar *Bunodosoma cangicum* em aquário no biotério aquático da Universidade Federal de Rio Grande. Fonte: arquivo pessoal de Vanessa A. dos Anjos.

Estudos utilizando este modelo ainda são poucos, sendo que a maioria dos trabalhos são usando, isolando ou caracterizando as toxinas que estes animais possuem (Cunha et al., 2005; Zaharenko et al., 2008a; Zaharenko et al., 2008b; Oliveira et al., 2012; Stas et al., 2013; Bastos Jr. et al., 2016). Com uma abordagem mais fisiológica e com a utilização de cobre poucos trabalhos são encontrados na literatura. Pode-se citar um com abordagem *in vivo*, avaliando a influência da pré-exposição ao cobre nas respostas bioquímicas frente a mudanças na disponibilidade de oxigênio (Abujamara et al., 2014), e outro desenvolvido por nosso grupo, *in vitro*, no qual foi desenvolvida uma cultura primária com as células do disco podal do animal, onde foram avaliadas respostas de citotoxicidade, estresse oxidativo, defesa celular (atividade MXR) e dano de DNA das células expostas ao metal (Anjos et al., 2014).

Apesar do pouco uso deste animal como modelo biológico, é importante conhecer como estes animais reagem frente à exposição aos poluentes, uma vez que são animais praticamente sésseis e que, portanto, possuem capacidade limitada de fuga das adversidades. Além disso, por serem animais que habitam zonas intermarés, são desafiados diariamente a mudanças abióticas, sendo estes

ambientes considerados fisiologicamente estressantes (Helmuth et al., 2006; Abujamara et al., 2014).

Com base em todo o panorama descrito, considera-se a anêmona *Bunodosoma cangicum* um bom modelo animal para responder as questões levantadas neste trabalho, pois são fáceis de coletar, apresentam uma boa viabilidade e número de células quando em cultura celular (Anjos et al., 2014), além de serem animais adaptados a variações abióticas no meio em que vivem, e que estão susceptíveis à poluição ambiental por cobre, pois os organismos utilizados no presente estudo foram coletados na região dos molhes da Praia do Cassino (Rio Grande, Brasil), que serve de entrada para o porto da cidade de Rio Grande.

### **Objetivo geral:**

Caracterizar o fenótipo MXR em células de anêmonas *B. cangicum* expostas ao cobre, estabelecendo a relação entre a atividade dessas proteínas e a bioacumulação do metal, e também conhecer se a atividade MXR se altera frente à exposição *in vivo* e *in vitro*, as variações de temperatura e salinidade, além da exposição ao cobre.

### **Objetivos específicos:**

- Caracterizar a atividade MXR em *B. cangicum* como uma via de efluxo de cobre.
- Avaliar a dependência energética da atividade MXR para o efluxo do metal.
- Avaliar a citotoxicidade causada pelo cobre quando a saída pelas proteínas ABC é comprometida.
- Quantificar a expressão de proteínas ABC em células expostas ao cobre.

- Avaliar a atividade MXR em células expostas a variações de temperatura e de salinidade, de forma isolada e em combinação com o cobre.
- Avaliar a citotoxicidade em células expostas as variações de salinidade;
- Avaliar o teor hídrico e o volume celular frente às variações de salinidade e exposição ao cobre.
- Comparar os resultados da atividade de MXR obtidos nas exposições *in vivo* e *in vitro*.



## Characterization of MXR activity in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* exposed to copper



Vanessa Abelaira Anjos<sup>a</sup>, Juliana Zomer Sandrini<sup>a,b</sup>, Cláudia Bueno Reis Martinez<sup>c</sup>,  
Marta Marques Souza<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande, do Sul, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciência Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Bioaccumulation  
Cellular defense  
Metal  
Metabolic activity  
Multiple xenobiotic resistance

### ABSTRACT

Transmembrane proteins of the ABC family contribute to a multiple xenobiotic resistance (MXR) phenotype in cells, driving the extrusion of toxic substances. This phenotype promotes a high degree of protection against xenobiotics. The present study provides a better understanding of the MXR activity in the podal disk cells of *Bunodosoma cangicum* exposed to copper, and further establishes the relationship between protein activity (measured by accumulation of rhodamine-B) and bioaccumulation of copper in these cells. Sea anemone cells were exposed for 24 h to copper (0, 7.8 and 15.6 µg/L) in presence and absence of MXR blocker (verapamil 50 µM). Results indicate that copper exposure increases intracellular metal content when ABC proteins were blocked, causing an increase in cellular death. The present study also verified the relationship between MXR activity, ATP depletion, and general metabolic activity (by MTT). MXR activity decreased in treatment groups exposed to copper concentrations of 15.6 µg/L and 10 mM energy depleting potassium cyanide. Metabolic activity increased in cells exposed to 7.8 µg Cu/L, but 15.6 µg Cu/L was similar to 0 and 7.8 µg/L. The presence of copper decreased the ABC proteins expression. The present study improves the knowledge of MXR in anemone cells and shows that this activity is closely associated with copper extrusion. Also, the copper exposure is able to modify the metabolic state and to lead to cytotoxicity when cells cannot defend themselves.

### 1. Introduction

The multiple xenobiotics resistance phenotype (MXR) is a capable of promoting cellular defense against exogenous substances and some endogenous metabolites, both *in vitro* and *in vivo* (Bard, 2000). This cellular resistance is expressed by a transmembrane super family of ABC transporter proteins (ATP binding cassette), which carry several xenobiotic substances out from the cells by active transport as a first line of cellular defense. The ABC proteins are well conserved throughout evolution and have already been identified in several groups of animals including sponges, cnidarians, mollusks, arthropods, fish and mammals (Epel, 1998; Bard, 2000; Kurelec et al., 2000; Ferreira et al., 2014). This capacity to extrude xenobiotic substances may confer different degrees of protection to animals living in contaminated areas (Kurelec et al., 2000).

One of the xenobiotic groups widespread in aquatic environments are the metals. Many studies have been performed to better understand how these substances affect cellular defense. Previous studies indicate

that metals may modify the activity/quantity of proteins associated with cellular MXR phenotype. Rocha and Souza (2012) observed a decrease in MXR activity in gills of *Corbicula fluminea* when exposed to lead, whereas Achard et al. (2004) observed an increase in ABC protein expression in bivalve gill cellular membrane when exposed to metals such as copper, cadmium, mercury, and zinc. However, the latter aforementioned authors did not analyze MXR activity. Della Torre et al. (2014) exposed *Mytilus galloprovincialis* to cadmium *in vivo* and *in vitro*. This study showed an increase in MXR activity and ABC gene expression when hemocytes and gill cells were exposed *in vitro*; however, *in vivo* exposure to cadmium resulted in an increase in gene expression without affecting MXR activity. Della Torre et al. (2012) demonstrated that MXR activity was inhibited in the PHLC-1 fish cell line (liver tumor cells) exposed to cadmium, mercury, arsenic, and chrome. Anjos et al. (2014) showed that MXR activity in sea anemone cells was variable when exposed to differing concentrations of copper *in vitro*. It is clear that the metal concentrations in experimental observations are important factors regarding MXR activity, gene expression and/or

\* Corresponding author at: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brazil.  
E-mail address: [martasouza@furg.br](mailto:martasouza@furg.br) (M.M. Souza).

abundance of these proteins in the cellular membrane.

Metals have been described as a factor that may influence the MXR activity of cells. However, there is little knowledge about the relationship among bioaccumulation and MXR activity. Jeong et al. (2014) showed that metal concentrations (copper, cadmium, and zinc) increase in exposed copepod *Tigriopus japonicus* when MXR was inhibited. This study was the first relating metal accumulation and MXR activity in an invertebrate, showing that these proteins could be a pathway for metal extrusion: under inhibition, metal accumulation increased in the animal body. However, further studies are necessary to better elucidate the relationship between MXR and metal accumulation.

*Bunodosoma cangicum* is a sea anemone that is commonly found in Southern Brazil, inhabiting intertidal zones and strongly adhere to rocks or the inside of sandy crevices (Melo and Amaral, 2005). Sea anemones are susceptible to environmental contamination due to their low mobility. Genes of this superfamily ABC had already been identified in cnidarians (Venn et al., 2009). Moreover, Anjos et al. (2014) have shown that *B. cangicum* exhibited cellular defense response against copper exposure through an increase of MXR activity. Therefore, *B. cangicum* cells may display ABC proteins; the activity of those proteins could be different under copper exposure. However, the specific defense mechanism is not characterized for these cells. The present study elucidates aspects of MXR activity in cells of *Bunodosoma cangicum* exposed to copper and establishes the relationship between protein activity and bioaccumulation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

All the salts used to prepare saline solution and PBS azide were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), as well as the culture medium M199, verapamil hydrochloride, potassium cyanide, Rhodamine B and (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and the secondary antibody anti-mouse immunoglobulin (Ig) G (tetra-rhodamine isothiocyanate) – TRITC. Copper chloride ( $\text{CuCl}_2$ ; Sigma) was used to prepare treatments. The antibiotic/antimitotic was purchased from Gibco®, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The monoclonal antibody C219 was from Signet-Covance® (Princeton, NJ, USA).

### 2.2. Collection and maintenance of anemones

*Bunodosoma cangicum* (Correa 1964) were manually collected in the intertidal area (32°09'40.25" S; 52°05'51.96" W) of Cassino Beach (Rio Grande, RS, Brazil). The animals were then transported to the laboratory in seawater and kept in glass aquariums at 20 °C temperature, constant aeration, photoperiod 12L:12D and salinity 30‰. The animals were fed once a week using small pieces of fish on the oral disk.

### 2.3. Extraction of sea anemone cells

Sea anemone cells were obtained through explant of pedal disk fragment generating primary culture as described by Anjos et al. (2014). The fragments were maintained in plate dish with 1 mL of culture medium M199 enriched with: (in mM) 41  $\text{NaHCO}_3$ , 80 KCl and 205 NaCl for adjustment of osmolality (approximately 800 mOsm kg/ $\text{H}_2\text{O}$ , equivalent to coelenteron fluid) and 3% antibiotic/antimitotic (compilation: penicillin-streptomycin-fungizone). After 48 h in culture, the cells were removed, centrifuged and the pellet was resuspended in saline solution (in mM: 400 NaCl, 9 KCl, 9  $\text{CaCl}_2$ , 46  $\text{MgSO}_4$ , 2.2  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7.4, approximately 800 mOsm kg/ $\text{H}_2\text{O}$ ). Density and viability of cells were analyzed via exclusion test with trypan blue 0.08%. All experiments were conducted with cells of viability above 80% and at a density of  $2\text{--}3 \times 10^5$  cells/mL (200  $\mu\text{L}$  for treatment).

### 2.4. Experimental conditions

Sea anemone cells were exposed to copper concentrations of 0  $\mu\text{g/L}$  (control, saline solution), 7.8  $\mu\text{g/L}$  and 15.6  $\mu\text{g/L}$  for 24 h. The 7.8  $\mu\text{g Cu/L}$  was defined with respect to Brazilian legislation (CONAMA resolution no. 357/2005), correspond to water quality criteria for Cu in sea water type II – intended for recreational fishing and recreational activities of secondary contact - and 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  was selected as a non-conforming concentration according to the Brazilian regulation. Same copper treatments were used in presence of ABC proteins blockers or decrease the energy available for the functionality of these proteins, including respectively:

Verapamil (VP) (50  $\mu\text{M}$  - pilot experiments were performed with 30 and 50  $\mu\text{M}$ , after those, the higher concentration was chosen) represents a well-known unspecific inhibitor of ABC proteins. VP acts as a calcium channel blocker and competes with other substrates as a competitive inhibitor (Srivalli and Lakshmi, 2012). A 1% Verapamil solution was prepared in ethanol and this solvent did not show any toxicity to sea anemones cells.

Potassium cyanide (KCN) 10 mM, is an ATP depletor that inhibits the electron transport chain (Watabe and Nakaki, 2007).

These experiments were conducted in independent days and animals (n represents one explant from one animal). Each experimental condition and exposures were performed in 96 wells micro plates or in 1.5 mL vials (for experiments of copper accumulation). All experiments were performed at least twice. Each chemical experiment (VP, KCN) was conducted with parallel experiments of cells exposed only to copper solutions (0, 7.8 and 15.6  $\mu\text{g/L}$ ), enabling results in absence of chemicals be grouped in the same MXR activity figures.

### 2.5. MXR analysis

MXR activity was measured based on cellular accumulation of rhodamine B (RB) which is a fluorescent substrate for ABC proteins (Kurelec et al., 2000). After exposure to copper in presence or absence of chemicals addition, cells were incubated in 10  $\mu\text{M}$  Rhodamine B (RB) for 60 min, during this time the blocker or ATP depletor was kept. Then, cells were washed twice with saline solution to remove the substrate excess and transferred to 96 well microplate. Cells were visualized under an epifluorescence microscope (Olympus IX81) equipped with a fluorescence filter (WG) and a digital camera in order to capture images for posterior analysis (using free software Image J). The fluorescence exhibited in the images was measured and normalized by the number of cells present in the bright-field. For each treatment, 3 images from the same sample (each well) were captured and measured, and the mean of fluorescence intensity per cell was calculated. Cells with higher accumulation of RB indicate lower MXR activity because they could not remove the fluorescent substrate, while a lower accumulation indicates a higher MXR activity due to more efflux.

### 2.6. Cytotoxicity

In order to understand if blocking the ABC proteins promotes higher metal cytotoxicity, sea anemone cells were exposed to the different copper concentrations in presence or absence of VP. Two parameters were considered to measure the cellular toxicity: viability (cellular membrane integrity was analyzed after 24 h of copper exposure) and the number of viable cells, both evaluated via a trypan blue (0.08%) exclusion test.

### 2.7. Copper accumulation

In order to determine the effective contribution of ABC proteins to copper extrusion, ABC proteins were blocked and cellular copper content was quantified. Sea anemone cells ( $2\text{--}3 \times 10^5$  cells/mL) were exposed to the different copper concentrations, for 24 h, in presence or

absence of VP. Following exposure, cells were washed and dehydrated for 24 h (50 °C), completely digested with 5 N HNO<sub>3</sub> and diluted with Milli-Q water. Copper concentration was measured via graphite atomizer atomic absorption spectroscopy (EAA Analyst 700, PerkinElmer), with detection limit of 0.0014 µg/L. The results obtained were normalized by the number of viable cells and expressed in µg Cu/10<sup>6</sup> cell.

## 2.8. General metabolic activity

The general metabolism activity was measured using the MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay. Sea anemone cells (10<sup>6</sup> cells/mL – higher number of cells were necessary in order to increase the absorbance signal) were exposed to copper solutions for 24 h, and cells were analyzed according to the specific protocol (Mosmann, 1983). This colorimetric MTT assay protocol measures the general metabolism of cells based on the cellular uptake of MTT and its subsequent reduction. Newer literature had shown that MTT could be converted in formazan not only in mitochondria but in other cellular compartments (Bernas and Dobrucki, 2002; Stockert et al., 2012). Higher metabolism activity results in higher formazan production. After copper exposure, cells were washed and incubated with MTT (500 µg/mL in saline solution) for 3 h. After that, the microplate was centrifuged (600 g for 5 min) and the supernatant was removed. Then, DMSO was added to dissolve the formazan crystals and the absorbance was recorded at 550 nm using EL808 (BioTek Instruments, USA). Results of MTT analysis were normalized by number of viable cells in each treatment (before MTT addition an aliquot was removed and counted).

## 2.9. ABC proteins expression

For the immunolabelling of ABC proteins, cells were exposed only to copper solutions as described before. After exposure, cells were washed to remove the contaminant and fixed in 4% formaldehyde in saline solution for 40 min. Then, cells were washed twice with phosphate buffer solution with added sodium azide (PBS; in mM: 340 NaCl, 12 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 KCl and 5 EDTA, 10 NaN<sub>3</sub>; pH 7.4, approximately ~800 mOsm kg/H<sub>2</sub>O) and kept in refrigeration (4 °C) overnight. In sequence, membrane cells were permeated using Triton X-100 for 15 min, washed with PBS azide and serum fetal bovine was added for 4 h. After this, the primary monoclonal antibody C219 against ABC proteins (MDR1/ABCB1 and MDR3/ABCB3), was added and maintained overnight. Subsequently, cells were washed with PBS azide to remove the excess of antibody and added the secondary antibody rabbit anti-mouse immunoglobulin (Ig) G was added for 5 h. Rinsing was repeated and cells visualized in epifluorescence microscope with a fluorescence filter (WG). The capture and analysis of images were performed equally those explained to MXR analysis. High fluorescence means a high amount of proteins in the cells.

## 2.10. Statistical analysis

Results from general metabolic activity and immunocytochemistry were satisfactory for parametric assumptions and were analyzed by one-way ANOVA with Tukey test *post hoc*, the graphic shows mean and standard error (SE).

Experiments results from chemicals exposure were tested by parametric assumptions (data normality and homogeneity of variances; data were mathematically transformed when assumptions were not verified), and then, analyzed through ANOVA factorial type II, in order to determine if chemicals interacted with copper exposure. As no interaction was observed among experiments, the results were submitted to two ANOVA one-way, using *post hoc* Unequal N HDS (MXR analysis) or Tukey (other analysis). In order to compare the results between those cells exposed to copper with cells exposed to chemicals (VP or KCN), a *t*-test for independent samples was performed. Figures show the mean

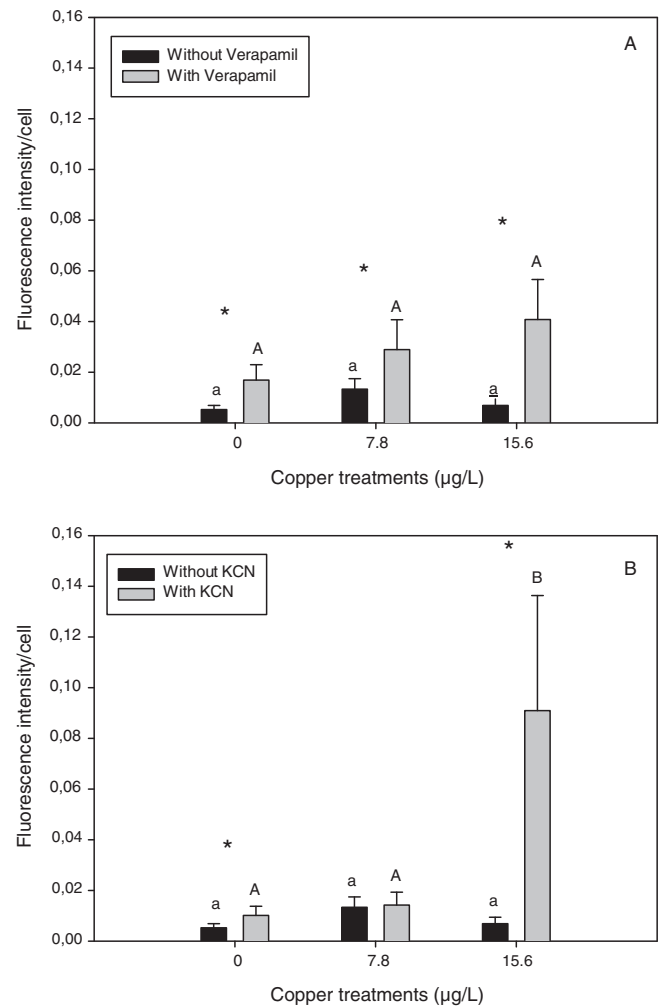


Fig. 1. MXR activity based on Rhodamine B accumulation in *B. cangicum* cells. Panel A: cells exposed to copper with/without verapamil (VP, n = 15–29). Panel B: cells exposed to copper with/without potassium cyanide (KCN, n = 11–29). Values represent means  $\pm$  standard error. Lowercase letters indicate differences between treatments without chemical (only Cu); capital letters indicate differences between treatments with MXR inhibitor; \* represents differences between same treatment without and with inhibitor.

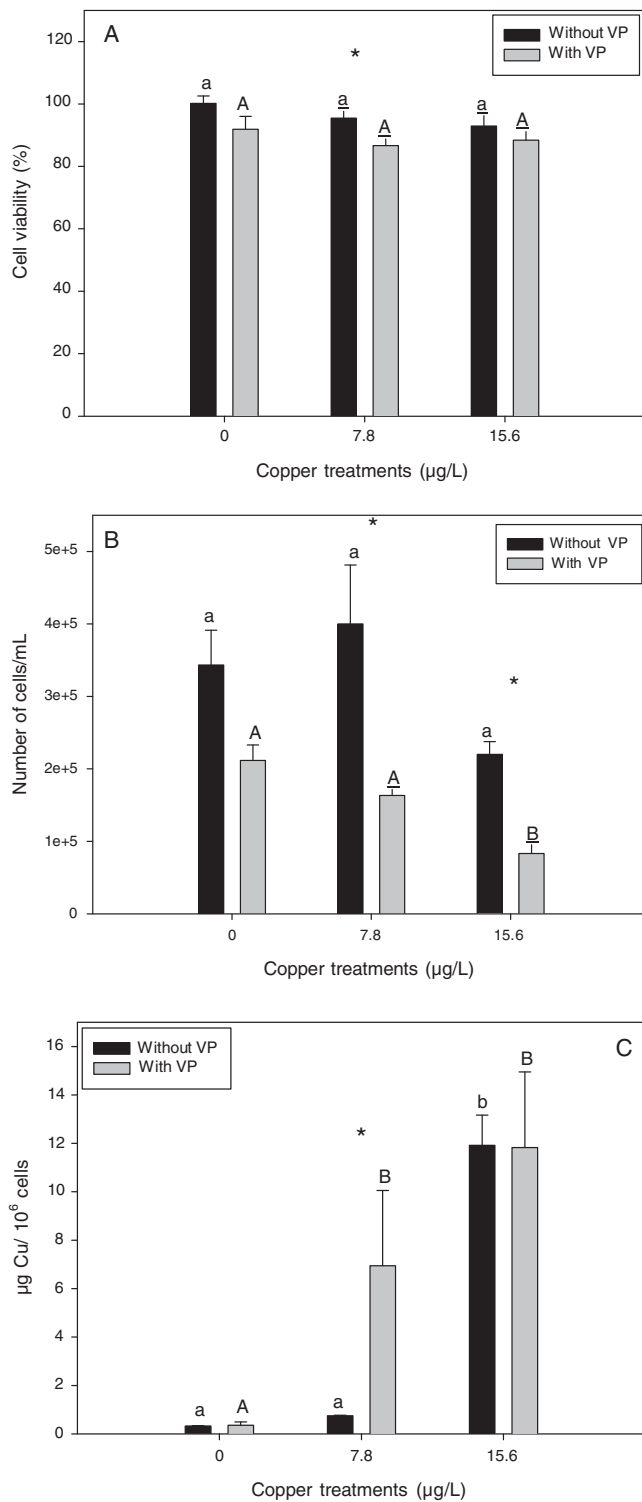
and SE results of raw data. All the results assumed a significant difference when values of  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. MXR analysis

MXR activity was not altered under copper concentrations of 7.8 and 15.6 µg/L ( $p = 0.43$ ) and it did not change even between copper exposures with VP ( $p = 0.61$ ) (Fig. 1A). The results of *t*-test analysis showed the inhibition of MXR activity in presence of verapamil in all copper concentrations. In absence of copper (0 µg/L), the presence of VP increased the rhodamine accumulation three-fold when compared with cells without VP ( $p < 0.001$ ). In cells exposed to 7.8 µg/L Cu, the presence of verapamil doubled the rhodamine accumulation ( $p = 0.0006$ ) and those cells with verapamil at 15.6 µg Cu/L had an almost 6-fold increase of rhodamine B accumulation in when compared with cells in absence of blocker ( $p < 0.001$ ).

Cells exposed to copper did not show any difference in MXR activity ( $p = 0.43$ ) (Fig. 1B). However, in cells exposed to copper and the ATP depletor potassium cyanide, the MXR activity was smaller at



**Fig. 2.** Panel A: viability of cells of *B. cangicum* exposed to copper with/without verapamil ( $n = 3$ ). Panel B: number of viable cells exposed to copper with/without verapamil ( $n = 3$ ). Panel C: copper accumulation in cells exposed to copper with/without verapamil ( $n = 4$ ). Values represent means  $\pm$  standard error. Lowercase letters indicate differences between treatments without VP (only Cu); capital letters indicate differences between treatments with VP; \* represents differences between same treatment without and with VP.

15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  treatment (increased 800% rhodamine B accumulation compared to control ( $p = 0.015$ )). Comparing results among absence/presence of KCN, results show that potassium cyanide inhibited MXR

activity in cells without copper and in 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  treatment (rhodamine B accumulated 2 and 15-fold, respectively).

### 3.2. Cytotoxicity

**Fig. 2A** shows sea anemone cells viability exposed to copper in presence or absence of verapamil and no statistical difference was observed. A decrease of cell viability (9%) was only observed in cells exposed to 7.8  $\mu\text{g/L Cu}$  with VP comparing to cells without blocker ( $p = 0.02$ ).

Number of cells of *B. cangicum* exposed to copper in presence or absence of VP is shown in **Fig. 2B**. No statistical difference was observed in absence VP treatments, however among cells in presence of VP one difference was observed. Samples incubated with VP decreased the number of cells when exposed to 15.6  $\mu\text{g/L Cu}$  comparing to 0  $\mu\text{g/L Cu} + \text{VP}$  cells (decreased 60%,  $p = 0.002$ ). Comparing the number of cells within each treatment, samples with copper and VP exposure showed fewer cells than those samples exposed to the same copper concentration without the blocker. The 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  in presence of VP treatment had a decrease of almost 60% in the number of cells compared to 0  $\mu\text{g/L Cu}$  in presence of VP treatment ( $p = 0.03$  and  $p = 0.003$  to 7.8 and 15.6  $\mu\text{g/L Cu} + \text{VP}$ , respectively).

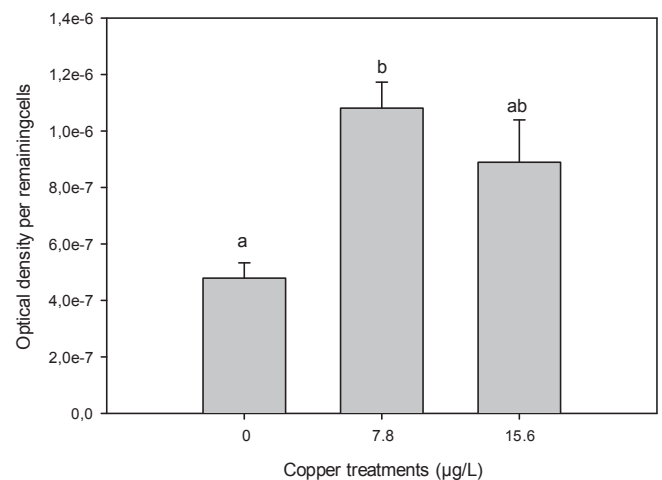
### 3.3. Copper accumulation

**Fig. 2C** shows the copper content of *Bunodosoma cangicum* cells. Considering the cells exposed to copper (without verapamil), the metal accumulation increased in 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  (10-fold more than cells in 0  $\mu\text{g/L Cu}$ ;  $p = 0.015$ ). In the presence of blocker, intracellular concentrations of copper were higher in both copper treatments when compared to control (0  $\mu\text{g/L Cu}$ ;  $p = 0.003$ ).

In presence or absence of the blocker in copper treatments, cells exposed to 7.8  $\mu\text{g Cu/L}$  had a 14-fold increase of the intracellular Cu ( $p < 0.0001$ ). The cells exposed to 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  had Cu increasing almost 2-fold when blocked with VP, however, it was not statistically different when compared to cells without VP ( $p = 0.31$ ). Control cells (0  $\mu\text{g Cu/L}$ ) did not differ from cells incubated with verapamil ( $p = 0.77$ ).

### 3.4. General metabolic activity

Metabolism was indirectly measured by MTT assay and the results are displayed in **Fig. 3**. Higher metabolic activity was observed in cells exposed to 7.8  $\mu\text{g/L Cu}$ , while the lesser activity was observed in cells



**Fig. 3.** General metabolic activity in *B. cangicum* cells exposed to copper, measured by MTT assay ( $n = 4-5$ ). Values represent mean  $\pm$  standard error and different letters indicate differences between treatments.



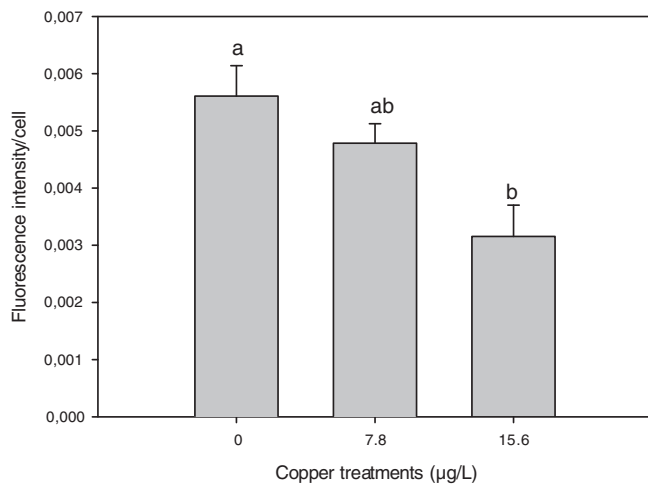


Fig. 4. ABC protein expression in *B. cangicum* cells exposed to copper ( $n = 4$ ). The measurement was based on the secondary antibody fluorescence per number of cells. Values represent mean  $\pm$  standard error and different letters indicate differences between treatments.

exposed to control (0  $\mu\text{g Cu/L}$ ;  $p = 0.017$ ). Results from 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  exposure had metabolism between the other treatments, and it was not statistically different ( $p = 0.07$  and  $0.457$ , respectively).

### 3.5. ABC proteins expression

Results of labeling cells using C219 are shown in Fig. 4. The 15.6  $\mu\text{g/L}$  copper exposure decreased the amount of ABC protein in sea anemones cells compared with no exposed cells ( $p = 0.014$ ). However, the amount of protein at 7.8  $\mu\text{g Cu/L}$  exposure was not statistically different from 0 and 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  ( $p = 0.477$  and  $0.093$ , respectively).

## 4. Discussion

Transmembrane proteins of the ABC family contribute to the MXR phenotype in cells, leading the extrusion of toxic substances. MXR activity is commonly associated with high degree of protection against xenobiotics. However, literature showing whether this pathway is also responsible for extrusion of metals, correlating MXR and xenobiotic accumulation is scarce. The present study provides a better understanding of the MXR activity in cells of *Bunodosoma cangicum* exposed to copper, and establishes an association between protein activity and bioaccumulation of copper in these cells.

Sea anemone cell responses to copper exposure vary according to MXR activity. When the cells are exposed to different copper concentrations (7.8 and 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$ ), no difference in the activity is observed. However, a tendency of inhibition at lower copper concentration and baseline activity (the same as 0  $\mu\text{g/L}$  copper) at higher metal concentrations was observed. Anjos et al. (2014) observed a different result, where MXR activity increased in sea anemones cells exposed to 7.8  $\mu\text{g Cu/L}$ , and returned to control activity levels at 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  exposure. These results indicate differences in MXR activity of copper concentrations (7.8 and 15.6  $\mu\text{g/L}$ ). Although only two copper concentrations were evaluated, the authors believe that it might be possible that the 7.8  $\mu\text{g/L}$  copper concentration represent a threshold concentration between activation and inhibition, thus varies, affecting MXR activity. Furthermore, the present study used a microscopy technique while the previous study (Anjos et al., 2014) used a fluorimetry technique. Microscopy involves observations of fluorescence inside of each cell while fluorimetry could produce noisier data, a fact corroborated by a study by Anjos et al. (2016) comparing both methods of MXR activity analysis. Therefore, the precise microscopy technique may have contributed to the differences observed in this study,

especially when the concentrations could induce variable activity.

MXR phenotype can be characterized by using ABC protein blockers and a fluorescent substrate, like rhodamine B. This characterization is largely used by adding verapamil (VP), a nonspecific inhibitor of ABC proteins, into the medium with cells. The VP inhibits substrate cell extrusion, resulting in higher fluorescence in cells incubated with the blocker (Kurelec et al., 2000; Shúilleabháin et al., 2005; Sandrine and Marc, 2007; Campos et al., 2014). In this study, the presence of the blocker inhibited the MXR activity in all copper concentrations when compared to treatments without VP (Fig. 1A). In order to verify if the blockade could increase bioaccumulation, the present study measured cellular metal content (Fig. 2C). When the MXR activity was compared in the presence and absence of VP, an increase in metal accumulation was observed in cells exposed to 7.8  $\mu\text{g Cu/L}$  when compared to the same copper treatment without VP. These results indicate the presence of copper and the blocker decreasing cellular defense, whereby metal extrusion is inhibited due to blocking of ABC proteins by VP. Blockade cells exposed to 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  did not show any difference in metal accumulation when compared to cells in the absence of the blocker. Fishes have a homeostatic regulation of copper uptake, reaching a steady state gradually after being exposed to metal for some time, where the time to achieve the plateau is variable to each specie (Marr et al., 1996; Taylor et al., 2000; Grosell and Wood, 2002). According to Marr et al. (1996), if the accumulation increases through exposure (time and concentration) and the accumulation capacity is regulated by depuration, the time to reach steady state will increase as the capacity of accumulation increases. Therefore, it is possible that sea anemones also have a similar accumulation dynamic and because the mechanism of copper extrusion has been overwhelmed and/or the uptake may have achieved its maximum, this way, the copper accumulation is similar in cells exposed to higher copper concentration, independent of MXR blockage.

Comparisons between xenobiotic accumulation and ABC protein activity are common in studies involving antitumor treatments, however, correlation with environmental scenarios are scarce. A relevant study to compare the results here is Jeong et al. (2014), who demonstrated that after inhibition of ABC proteins with verapamil, the xenobiotic accumulation increases. In their study, copepods were exposed to cadmium, copper, and zinc for 24 h, associated or not with a specific inhibitor. As a result, the animals incubated with the inhibitor and exposed to metals had higher metal accumulation (analyzed by fluorescence labeling intensity). Furthermore, copepod mortality increased in metal treatments (copper, cadmium, and zinc) with inhibited ABC proteins, allowing the authors to conclude that verapamil is a cellular inhibitor of metal efflux, resulting in high mortality.

In order to analyze the blockage of ABC proteins and copper cytotoxicity in *B. cangicum*, the viability of sea anemone cells exposed to copper in the presence or absence of verapamil was evaluated. In general, the viability of cells exposed to the different copper treatments in the presence or absence of verapamil is not modified, however the ABC protein blockage causes a decrease in cell viability in cells exposed to 7.8  $\mu\text{g Cu/L}$  when compared to cells exposed to the same copper concentration but without verapamil (Fig. 2A). On the other hand, in the samples with 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  and VP, the number of cells reduced significantly despite the similar viability. Anjos et al. (2014) showed that sea anemone cells exposed to copper 15.6  $\mu\text{g/L}$  decreased the viability and number of cells due to cellular committal. The copper concentration used in their study was the same as that used here, and the difference found in viability could be explained by the method applied. Although the method was the same, the trypan blue exclusion method analyzes the membrane integrity and takes an immediate evaluation, and even small temporal differences between each analysis might tend to overestimate the cell viability (Freshney, 2010), thus to measure the cytotoxicity, it is recommended to use the number of cells as well. It is therefore clear that MXR activity contributes to the efflux of metals from cells and this extrusion is important to maintain the cells

healthy. It is observed that the ABC proteins blockade decreases the viability in cells exposed to 7.8 µg Cu/L when comparing the absence and presence of VP, besides, the number of cells decreases in both copper concentrations when co-exposed to verapamil. Therefore, the cytotoxicity increased when cells were exposed to verapamil combined with copper concentrations. Anjos et al. (2014) analyzed the cytotoxicity and MXR activity in 6 and 24 h. In the first 6 h, the copper damaged the cellular membrane but did not reduce the number of cells nor alter the MXR activity. After 24 h, the membrane integrity was debilitated and the copper led to cellular death, reducing the number of cells, similar to the findings here. They also found that when MXR activity was activated the number of cells did not reduce despite the viability decrease. Therefore, the extrusion of copper by MXR is effective in protecting the cells and the combined analysis of membrane integrity and number of cells is a better form of estimating the cytotoxicity.

Additionally, the results of general metabolic activity could be related to the viability and number of cells in the presence of copper (without VP). A higher metabolic activity was observed in 7.8 µg Cu/L, indicating that cells were spending energy to counter the toxic effects. This is effective, observing that the viability, number of cells and MXR activity remained similar to cells with 0 µg Cu/L. The increase in metabolic activity seems to deal with the stressor. However, 15.6 µg Cu/L samples showed a general metabolic activity between 0 and 7.8 µg Cu/L and indicated that although cells try to maintain their health, they could not handle more in this situation and the copper reduced the number of cells, i.e., cell death occurred. In the literature, MTT analysis is shown as a measurement for cellular viability (Rtal et al., 1996; Le Bihan et al., 2004; Vazzana et al., 2014). However, it may not be a good indicator since the MTT assay is related to general metabolic activity (Bernas and Dobrucki, 2002; Stockert et al., 2012), thus, results could over or underestimate the viability depending on the cells metabolic state.

MXR activity is an ATP-dependent mechanism that may be compromised in an ATP depletion state. An experimental ATP depletion is performed by using mitochondrial electron transport chain complex I and IV inhibitors such as potassium cyanide (Watabe and Nakaki, 2007). The aforementioned study observed that potassium cyanide decreased MXR activity after exposure to 15.6 µg Cu/L (Fig. 1B). Presumably, cellular extrusion at the highest concentration of copper exposure became too energetically expensive and was subsequently disrupted, whereas the lower copper concentration was controlled.

The results discussed above are unprecedented in current literature, and to the best of knowledge of the authors, it is the first time that metal content measurements in cnidarian cells are related to MXR activity and cytotoxicity. Moreover, the present study elucidates aspects of the energy system involving ABC proteins such as energy requirement and general metabolism activity.

The present study also evaluated the ABC protein expression in sea anemones cells. It is showed that the 15.6 µg Cu/L treatment decreased the ABC proteins expression in the cellular membrane of *B. cangicum*. Although other studies show that copper induces this ABC protein and genic expression (Achard et al., 2004; Venn et al., 2009), it is well known that copper is a transition metal that may increase reactive oxygen species (ROS) (Stohs and Bagchi, 1995; Gaetke and Chow, 2003; Sandrini et al., 2009; Main et al., 2010; Grosell, 2012). ROS can impair proteins, copper could also bind directly to protein amino acids, potentially leading to dysfunctionality (Gaetke and Chow, 2003; Roy et al., 2009; Grosell, 2012; Tamás et al., 2014). In the study of Anjos et al. (2014), it was observed that reactive oxygen species increase in sea anemones cells exposed to 7.8 µg Cu/L, and even more so to 15.6 µg Cu/L. Therefore, the hypothesis in this work that ROS is causing the impairment in ABC protein expression is supported. This dysfunctionality, caused by heavy metals in general (directly or indirectly), could be attributed to perturbation in protein folding, leading the proteins to an inactive state from an incorrect conformation (Sharma et al., 2008; Tamás et al., 2014). Cells had the ability to degrade

abnormally folded proteins, leading to their hydrolysis (Goldberg, 2003). Therefore, the decrease in ABC protein expression is possibly a result of processes combination: ROS increase, damage in ABC proteins and conformational state with subsequent hydrolysis.

In summary, MXR activity remained similar to control groups in all copper treatments, and cytotoxicity was avoided even with higher copper accumulation in cells exposed to 15.6 µg Cu/L, however, the copper toxicity impaired the ABC protein expression. These results indicate an effective cellular defense system in cells exposed to copper, mainly at 7.8 µg Cu/L, even without increasing the MXR activity. These cells defend themselves pumping the excess copper out and protecting against cytotoxicity. However, the cost of this adjustment was observed through an increase in metabolic activity. Furthermore, the MXR activity seems to be closely associated with copper extrusion, since cellular copper content and cytotoxicity increased when MXR activity was inhibited. The present study showed novel cellular response patterns to metal exposure, MXR activity, and protein expression, it also elucidates the cellular defense mechanisms of *Bunodosoma cangicum* after being exposed to copper.

### Acknowledgements

V.A. Anjos had support from CAPES (42004012008P9) – Brazil. This work had the financial support of the National Institute of Science and Technology in Aquatic Toxicology (INCT-TA, CNPq 573949/2008-5). Authors would like to thank Dr. Lygia Segal Nogueira for the English review of the manuscript and Dr. Enelise Marcelle Amado for the antibody C219 donation.

### References

- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347–357.
- Anjos, V.V., Siva-Jr, F.M.R., Souza, M.M., 2014. Cell damage induced by copper: an explant model to study anemone cells. *Toxicol. In Vitro* 26, 365–372.
- Anjos, V.V., Galvão, J.S., Santos, V.R.S., Souza, M.M., 2016. *Mesodesma mactroides* gill cells exposed to copper: does hyposmotic saline increase cytotoxicity or cellular defenses? *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-016-1911-7>.
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389.
- Bernas, T., Dobrucki, J., 2002. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 47, 236–242.
- Campos, B., Altenburger, R., Gómez, C., Lacorte, S., Piña, B., Barata, C., Luckenbach, T., 2014. First evidence for toxic defense based on the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 148, 139–151.
- CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente – Resolution Nº 357/2005. available in <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> (access in March 2016).
- Della Torre, C., Zaja, R., Loncar, J., Smital, T., Focardi, S., Corsi, I., 2012. Interaction of ABC transport proteins with toxic metals at the level of gene and transport activity in the PLHC-1 fish cell line. *Chem. Biol. Interact.* 198, 9–17.
- Della Torre, C., Bocci, E., Focardi, S.E., Corsi, I., 2014. Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Mar. Environ. Res.* 93, 56–63.
- Epel, D., 1998. Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms. *Comp. Biochem. Physiol. A* 120, 23–28.
- Ferreira, M., Costa, J., Reis-Henriques, M.A., 2014. ABC transporters in fish species: a review. *Front. Physiol.* 5.
- Freshney, I., 2010. Cytotoxicity – Chapter 21, in *Culture of Animals Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6th ed. John-Wiley & Sons, New Jersey (732 pp.).
- Gaetke, L., Chow, C.K., 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147–163.
- Goldberg, A.F., 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895–899.
- Grosell, M., 2012. Copper, in homeostasis and toxicology of essential metals. *Fish Physiol.* 31 (A), 53–133.
- Grosell, M., Wood, C.M., 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J. Exp. Biol.* 205, 1179–1188.
- Jeong, C., Kim, B., Kim, R., Park, H.G., Lee, S., Shin, K., Leung, K.M., Rhee, J., Lee, J., 2014. Functional characterization of P-glycoprotein in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* and its potential role in remediating metal pollution. *Aquat. Toxicol.* 156, 135–147.

- Kurelec, B., Smital, T., Pivčević, B., Eufemia, N., Epel, D., 2000. Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein and chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9, 307–327.
- Le Bihan, E., Perrin, A., Koueta, N., 2004. Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda): effect of Cu, Zn and Ag on enzyme activities and cell viability. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 309, 47–66.
- Main, W.P.L., Ross, C., Bielmyer, G.K., 2010. Copper accumulation and oxidative stress in the sea anemone, *Aiptasia pallida*, after waterborne copper exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 151, 216–221.
- Marr, J.C.A., Lipton, J., Cacula, D., Hansen, J.A., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Hogstrand, C., 1996. Relationship between copper exposure duration, tissue copper accumulation, and rainbow trout growth. *Aquat. Toxicol.* 36, 17–30.
- Melo, K.V., Amaral, F.D., 2005. Ampliação da distribuição das anêmonas-do-mar (Cnidaria, Actiniaria) no estado de Pernambuco. *Brasil. Trop. Ocean* 33, 19–31.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Rocha, C.T., Souza, M.M., 2012. The influence of lead on different proteins in gill cells from the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*, from defense to repair biomarkers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 56–67.
- Roy, D.N., Mandal, S., Sen, G., Biswas, T., 2009. Superoxide anion mediated mitochondrial dysfunction leads to hepatocyte apoptosis preferentially in the periportal region during copper toxicity in rats. *Chem. Biol. Interact.* 182, 136–147.
- Rtal, A., Nonnotte, L., Truchot, J.P., 1996. Detoxification of exogenous copper by binding to hemolymph proteins in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Aquat. Toxicol.* 36, 239–252.
- Sandrine, P., Marc, P., 2007. Identification of multixenobiotic defense mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. *Chemosphere* 67, 1258–1263.
- Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.M., Nery, L.E.M., Marins, L.F.F., 2009. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquat. Toxicol.* 95, 285–291.
- Shúilleabháin, S.N., Davoren, M., Mothersill, C., Sheehan, D., Hartl, M.G., Kilemade, M., O'Brien, N.M., O'Halloran, J., Van Pelt, F.N., Lyng, F.M., 2005. Identification of a multixenobiotic resistance mechanism in primary cultured epidermal cells from *Oncorhynchus mykiss* and the effects of environmental complex mixtures on its activity. *Aquat. Toxicol.* 73, 115–127.
- Sharma, S.K., Goloubinoff, P., Christen, P., 2008. Heavy metals ions are potent inhibitors of protein folding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372.
- Srivalli, K.M.R., Lakshmi, P.K., 2012. Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. *Braz. J. Pharm. Sci.* 48.
- Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R.W., Villanueva, A., 2012. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 114, 785–796.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321–336.
- Tamás, M.J., McGeer, J.C., Wood, C.M., McDonald, D.G., 2014. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomol. Ther.* 4.
- Taylor, L.N., McGeer, J.C., Wood, C.M., McDonald, D.G., 2000. Physiological effects of chronic copper exposure to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in hard and soft water: evaluation of chronic indicators. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2298–2308.
- Vazzana, M., Celi, M., Tramati, C., Ferrantelli, V., Arizza, V., Parrinello, N., 2014. *In vitro* effect of cadmium and copper on separated blood leukocytes of *Dicentrarchus labrax*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 102, 113–120.
- Venn, A.A., Quinn, J., Jones, R., Bodnar, A., 2009. P-glycoprotein (multi-xenobiotic resistance) and heat shock protein gene expression in the reef coral *Montastraea franksi* in response to environmental toxicants. *Aquat. Toxicol.* 93, 188–195.
- Watabe, M., Nakaki, T., 2007. ATP depletion does not account for apoptosis induced by inhibition of mitochondrial electron transport chain in human dopaminergic cells. *Neuropharmacology* 52, 536–541.

**Manuscrito**

*Could temperature and salinity interfere in Multiple Xenobiotic Resistance activity even in copper absence?*

Anjos, Vanessa Abelaira <sup>a</sup>; Sandrini, Juliana Zomer<sup>a,b</sup>; Souza, Marta Marques <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

**Running title:** MXR in anemone exposed to abiotic factors and copper

\*Corresponding Author (*Present Address*)

Dra. Marta M. Souza

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande - FURG,  
Rio Grande, RS Brazil Phone: +55-53-3233-5192 Fax: +55-53-3233-6848

e-mail: [martasouza@furg.br](mailto:martasouza@furg.br)

*Este manuscrito será submetido ao periódico **Ecotoxicology and Environmental Safety** e está apresentado aqui no formato editado.*

## ABSTRACT

The use of biomarkers is an important tool to predict possible physiological alterations to the organisms exposed to contaminated environments. One of the biomarkers that have a protective role in animals is the multixenobiotic resistance (MXR) phenotype, which is able to eliminate toxic substances of the cells. There are several studies describing the activity of these proteins after pollutant exposure, but little is known about the interference of abiotic factors on these. Therefore, the present study aimed to evaluate the MXR activity through the accumulation of rhodamine B in *in vivo* and *in vitro* exposures. The sea anemones *Bunodosoma cangicum* were exposed to different temperatures (15, 20 and 25°C) and salinities (15, 30 and 45‰) associated or not with copper exposure (0, 7.8 and 15.6 µg/L). Results showed that abiotic factors altered the MXR activity; low temperature inhibited the activity both *in vivo* and *in vitro*, while salinity did not alter the MXR activity. The presence of copper could lead to another type of response (inhibition or activation), mainly in different temperatures. The results for MXR activity found between *in vivo* and *in vitro* exposures were similar among temperature treatments also salinities, however in osmotic shocks the behavior of animals and isolated cells were different. It can be concluded that abiotic factors affect MXR activity independently of the presence of copper and, although the results were not completely similar in animals or isolated cells, each model contributes in a different way of knowledge. The *in vitro* is better to evidence mechanisms while *in vivo* is more indicated to show systemic response, once this model could protect themselves against hypersalinity through mucus' layer while in *in vitro* exposure this osmotic challenge carried the cells to death.

## HIGHLIGHTS

- Low temperature inhibits MXR activity in sea anemones;
- Temperature combined with copper exposure changes the MXR response;
- Salinity did not affect MXR activity;
- Hyperosmotic shock is stressful to sea anemones.

Keywords: copper, multixenobiotic resistance, primary cell culture, sea anemones.

## 1. INTRODUCTION

The aquatic environment is susceptible to be contaminated by substances, could leading the organisms to health's damage. Biomarkers are tools that aim to

predict the consequences of the interactions among these substances and the exposed organisms. They are a way to measure at molecular or cellular level the biological effect, anticipating changes that could occur at higher levels of organization (Cajaraville et al., 2000). Commonly they are divided into exposure and effect biomarkers, where first indicates that the organism is exposed to some xenobiotic while the second demonstrates the adverse effect which this substance is causing in the organism (Walker et al., 2001).

Among the biomarkers of exposure, some of them prevent cells to accumulate substances, i.e., in a protective mechanism (Kurelec et al., 2000). A biomarker that has this type of response is the phenotype of resistance to multiple xenobiotics (MXR), also known as cellular defense biomarker (Kurelec et al., 2000). This phenotype is expressed by a superfamily of protein transporters, the ABC (ATP-binding cassette) family. These transmembrane proteins can carry out from cells several types of substances, which contributes to confer to animals different levels of resistance when exposed to xenobiotics (Bard, 2000; Kurelec et al., 2000).

The literature has already described that several types of substances could change the activity of these proteins, which is able to cause inhibition, activation, or inhibit or activate depending on the concentration; such as organic compounds, metals, pharmaceuticals, pesticides (Timofeyev et al., 2007; Kingtong et al., 2007; Rocha and Souza, 2012; Fernández-Sanjuan et al., 2013; Ferreira et al., 2014; Oliveira et al., 2014; Cunha et al., 2017). About metals, copper (Cu) is one substance that might interact with ABC proteins. Achard and collaborators (2004) described an increase in ABC protein expression when mollusks *Corbicula fluminea* were exposed to this metal; besides our previous study verified that MXR activity was higher in cells of anemones *Bunodosoma cangicum* exposed to Cu (Anjos et al., 2014). Furthermore, evidence of these ABC proteins being a pathway to copper efflux has been demonstrated by Jeong and collaborators (2014) in copepods and, in our previous work that used cells isolated from *B. cangicum* (Anjos et al., 2017). Both studies established a relation between ABC inhibition, metal accumulation, and toxicity – when MXR was inhibited, Cu bioaccumulation was higher as well the animal/cellular death.

However, the MXR activity seems to be not only xenobiotic target. Some authors had already reported a correlation between temperature and ABC proteins (Minier et al., 2000; Eufemia and Epel, 2000; Keppler and Ringwood, 2001a,b). Moreover, Luedeking and Koehler (2004) described that abiotic factors such salinity and oxygen availability could modify the genic expression of ABC proteins. Nevertheless, all the studies cited above were without xenobiotic presence, and the combination of abiotic factors and contaminants is scarce in the literature. As far we know, only our previous work (Anjos et al., 2016) evaluated the MXR activity in isolated gill cells of *Amarilladesma mactroides* exposed to copper with osmotic shock, showing that activity increased in those cells exposed to the hyposmotic solution, independently of copper presence.

Despite the studies with abiotic factors described above, still necessary more studies to better understand how is the interaction between environment, xenobiotic, and the MXR activity, once this MXR phenotype might be used as a biomarker. Answering if the abiotic factors could interfere with ABC proteins responses, and how this occurs, is necessary to prevent misinterpretation when using it as an exposure biomarker to pollution.

The sea anemones *Bunodosoma cangicum* had already shown the presence of MXR activity in our previous studies (Anjos et al, 2014; Anjos et al., 2017). We choose this biological model because they live in an intertidal zone, i.e., they suffer daily with abiotic stressors, and are able to be contaminated with copper. Additionally, with this model, our research group has already established a primary cell culture protocol (Anjos et al., 2014), what allows the study *in vitro*, and because of this, offers the comparison with the answers obtained in *in vivo* exposure.

In light of the above, we evaluated the effect on MXR activity of abiotic factors, such as salinity and temperature, associated with copper in sea anemones *Bunodosoma cangicum* both *in vivo* as *in vitro* exposures, also, comparing this.

## 2. MATERIALS AND METHODS:

### 2.1. Collection and maintenance of anemones:

*Bunodosoma cangicum* Correa 1964 were manually collected in the intertidal area of Cassino Beach – Molhes da Barra (Rio Grande, RS, Brazil, 32°09'40.25" S; 52°05'51.96"). The animals were then transported to the laboratory in seawater where they were kept during one week in glass aquariums at 20°C temperature, with constant aeration, photoperiod 12L:12D and salinity 30‰ before the experiments, in order to acclimatize them. The animals were fed each week with pieces of fish on the oral disk.

## 2.2. *In vivo* exposures:

### 2.2.1. Experimental conditions:

**Temperature experiments:** the animals were distributed among the treatments: 15, 20 and 25°C and copper concentrations of 0 (saline solution - in mM: 400 NaCl, 9 KCl, 9 CaCl<sub>2</sub>, 46 MgSO<sub>4</sub>, 2.2 NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4, ≈900 mOsm kg/H<sub>2</sub>O, corresponding to salinity 30), 7.8 and 15.6 µg/L (saline solution + copper chloride). These Cu nominal concentrations were defined with respect to Brazilian legislation: CONAMA Resolution No. 357/2005, in saline water type II – destined to recreational fishing and secondary contact recreation – and its doubled, respectively. A total of nine treatments composed the experiment because of the combination of both factors (15°C with 0, 7.8, 15.6 µg Cu/L; 20°C with 0, 7.8, 15.6 µg Cu/L; 25°C with 0, 7.8, 15.6 µg Cu/L). Five animals were exposed, for each experimental condition, in plastic beakers (previously acidified in nitric acid 1%) containing 150mL of saline solution of each copper treatment and kept for 24 hours. Each temperature group remained in incubators, with temperature and photoperiod-controlled (12L:12D).

**Salinity experiments:** the animals were distributed among the treatments: 15, 30 and 45‰. Different saline solutions were prepared by the same way of saline solution described above (≈900 mOsm kg/H<sub>2</sub>O), however the solution was diluted and concentrated as necessary (≈450 and ≈1350 mOsm kg/H<sub>2</sub>O, respectively) and copper concentrations of 0, 7.8 and 15.6 µg/L, in combinations of both factors similar to temperature experiments. Five animals were exposed to each treatment for 24 hours in an incubator with 20°C and photoperiod of 12L:12D.

### 2.2.2. MXR analysis:



After exposure time, the animals were anesthetized in a 200mM magnesium solution (saline solution + 200mM MgCl<sub>2</sub>) for 20 min (for salinity experiments, the saline solution used to anesthetize was that for respective treatment). Then, a fragment of the podal disk was removed and incubated in 10μM rhodamine B (fluorescent dye substrate for ABC proteins) for 2 h. For the temperature experiments, the rhodamine B (RB) solution was prepared in saline solution (≈900 mOsm/kg H<sub>2</sub>O), while for the salinities experiments the rhodamine B solution was produced in the respective osmolality of each treatment. During the incubation time, the temperature was 20°C for salinities experiments and the respective temperature of each treatment for temperatures experiments. Next, the fragments were washed out twice to remove the dye excess, weighted and frozen overnight. In the next day, podal disk fragments were homogenized in distilled water (400μL) and centrifuged at 7500g for 5 min. The supernatant (250μL) was transferred to a dark opaque microplate of 96 wells and the fluorescence was analyzed, with excitation and emission of 485 and 590 nm, respectively (Victor 2, Perkin Elmer). The results were normalized by the wet weight of each fragment and the graphics expressed the relative values (where 0 μg/L in 20°C or salinity 30‰ was considered 100%). The result are interpreted based on RB accumulation, where higher fluorescent accumulation indicates lower activity and lesser accumulation is higher activity

### 2.2.3. Tissue water content:

Those animals that were exposed to salinity experiments had their water tissue content measured. After anesthetics procedures, a fragment of the podal disk was removed, weighted and put to dry in 50°C for 48 h. The dried tissue was weighted and the water content was calculated using the dry weight and wet weight, according to the equation:  $Wc = (dry\ weight \div wet\ weight) \times 100$ , where  $Wc$  is the tissue water content, expressed in percentage.

## 2.3. *In vitro* exposures:

### 2.3.1. Primary cell culture

A primary cell culture from an explant of *Bunodosoma cangicum* was performed to obtain the cells as described by Anjos and collaborators (2014). A

fragment of podal disk were maintained for 48 h in plate disc with 1 mL of culture medium M199 enriched with (in mM) 41 NaHCO<sub>3</sub>, 80 KCl and 205 NaCl for adjustment of osmolality ( $\approx$ 900 mOsm kg/H<sub>2</sub>O, equivalent to coelenteron fluid), and 3% antibiotic/antimitotic (compilation: penicillin-streptomycin-fungizone). After this time in culture, cells were removed, centrifuged to 600g for 5 min. The supernatant was removed and the cell pellet was resuspended in saline solution. Using a Neubauer chamber, density and viability of cells were analyzed via exclusion test with trypan blue (0.08%). The experiments were conducted with cells of viability above 80% and at a density of 2-3 x 10<sup>5</sup> cells/mL, where 200  $\mu$ L was used for each treatment.

### 2.3.2. Experimental conditions:

The exposures to salinity and temperature experiments were performed in the same treatments conditions of the *in vivo* exposures, respectively. The microplates of temperature experiments were maintained in incubators with temperature controlled. The microplates of salinity experiments were maintained in an incubator with temperature controlled (20°C) for 24 h. The cells were maintained in those respective saline solution during the exposure time in order to not compromises the copper treatments. This method does not harm the cellular viability as showed by Anjos and collaborators (2014).

### 2.3.3. MXR analysis:

MXR activity was measured based on the cellular accumulation of rhodamine B (RB) as described by Kurelec and collaborators (2000). After exposures, cells were washed and incubated in 10  $\mu$ M RB for 60 min, produced in the respective saline solution and maintained at the temperature of each treatment, as for *in vivo* exposures. Then, the cells were washed twice with saline solution to remove the substrate excess (keeping the same salinity from each treatment) and were kept in clean saline for an additional time of 60 min. After this time, the cells were washed and maintained in saline solution where were visualized under an epifluorescence microscope (Olympus IX81) equipped with a fluorescence filter (WG) and a digital camera in order to capture images for posterior analysis (using free software Image J). The fluorescence exhibited in the images was measured and normalized by the

number of cells present in that field (bright field). For each treatment, 3 images from the same sample (each well) were captured and measured, and the mean of fluorescence intensity per cell was calculated. The results are interpreted of the same way of *in vivo*, based on fluorescent accumulation and the graphics also are expressed relativized, where the result in control salinity (30‰) and temperature (20°C) with 0 µg Cu/L were considered 100%.

#### 2.3.4. Cytotoxicity:

In order to evaluate the salinity experiments cytotoxicity, the cells were analyzed under two aspects: viability, by membrane integrity, and number of viable cells remained in each treatment. Both parameters were measured by trypan blue 0.08% exclusion test, using a Neubauer chamber.

#### 2.3.5. Cellular volume:

The volume of cells exposed to salinity experiments was measured using the images (bright field) that were captured for MXR analysis. The area of cells was measured using the software Image J, and this area was used to calculate the volume. For each treatment, 40 cells of different samples were measured.

#### 2.4. Statistical analysis:

The results of MXR activity with different salinities and temperatures without copper addition (0 µg/L), also tissue water content, cellular volume and cytotoxicity parameters attended the parametric assumptions and were performed ANOVA one-way with *post hoc* Fisher or Tukey. The graphics show the mean ± SE results, with a significant difference when values of  $p \leq 0,05$ .

The results of experiments of MXR activity with salinity or temperature with all copper treatments, both *in vivo* and *in vitro* were tested by parametric assumptions, it being transformed when they did not attend the assumptions. Then, it was applied ANOVA factorial with *post hoc* Unequal N or Fisher. In the analysis which ANOVA showed significant interaction between factors, the predicted effect was calculated (Bliss, 1939) in order to compare observed and predicted effects and to evaluated the interaction. The combined effect was measured for each combination of temperature/salinity and copper addition. According to Crain and

collaborators (2008), antagonism could be assumed when the combined effect observed is smaller than the predicted, and synergism when the observed effect is higher than predicted.

The graphics show the mean  $\pm$  SE results of relativized data. All the results assumed a significant difference when values of  $p \leq 0,05$ .

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Temperature effects in MXR activity

The results about temperature changes in *in vivo* and *in vitro* exposures were presented in figure 1A. The *in vivo* results showed that 15°C decreased the MXR activity in relation to control (20°C), while 25°C was similar to control temperature. In the *in vitro* results, we also observed lower temperature inhibiting the activity in relation to control (20°C), while in 25°C the cells had an activity similar to 15°C and 20°C. Highlighting, more fluorescent accumulated indicates less activity, and less fluorescent accumulated indicates more activity. We choose 20°C as control temperature because this was temperature average recorded by Odebrecht and collaborators (2010) analyses from 1992 to 2007 in the Cassino Beach. Additionally, 15 and 25°C were chosen because they are environmentally relevant temperatures for winter and summer in the Cassino Beach, respectively, according to Gouveia and collaborators (2015). So, as the MXR activity was smaller in those animals or cells exposed to lower temperature and this temperature was the mean found in water temperature during winter. The animals during this season could be more sensitive to pollution. It is known that temperature influences directly the metabolic rate, especially for ectothermic animals (Clarke and Fraser, 2004; Sokolova and Lannig, 2008). Furthermore, Anjos and collaborators (2017) had already shown that the general metabolic state of *B. cangicum* change when the cells were exposed to copper, and this reflects in the MXR activity, indicating that the increase in cellular protection conferred by MXR activity, leads the cells to improve their metabolic cost. Thus, it is possible that sea anemones showed a lower MXR activity because lower temperature diminished their metabolism, acting as proposed to Anjos et al (2017) but in an inverse way, i.e., lower metabolic state, lower MXR activity. As the ABC

proteins perform the substrate efflux with ATP spending and at low metabolic state the ATP production is smaller, this might explain the MXR activity inhibition at lower temperature. For higher temperature (25°C), MXR activity does not differ to control both *in vivo* and *in vitro* exposures, however, a tendency of inhibition could be seen in the isolated cells. The current literature has already shown that increasing temperature could induce the MXR activity in mollusks (Eufemia and Epel, 2000; Pain et al., 2007) as well as could increase the protein expression (Minier et al., 2000; Keppler and Ringwood, 2001a,b). All those experiments aforementioned where *in situ* under seasonal variations, and the authors attributed the increased in MXR activity and expression to metabolic factors as reproduction, or because the physicochemical water parameters, or still because the growth of micro-organisms and phytoplankton that could increase the occurrence of natural toxins. In other words, the authors consider the higher temperature as an indirect effect. Our experiment was performed in the laboratory without or with the minimum interference of these variations above mentioned, and the *in vivo* exposure to higher temperature did not demonstrate difference in relation to control.

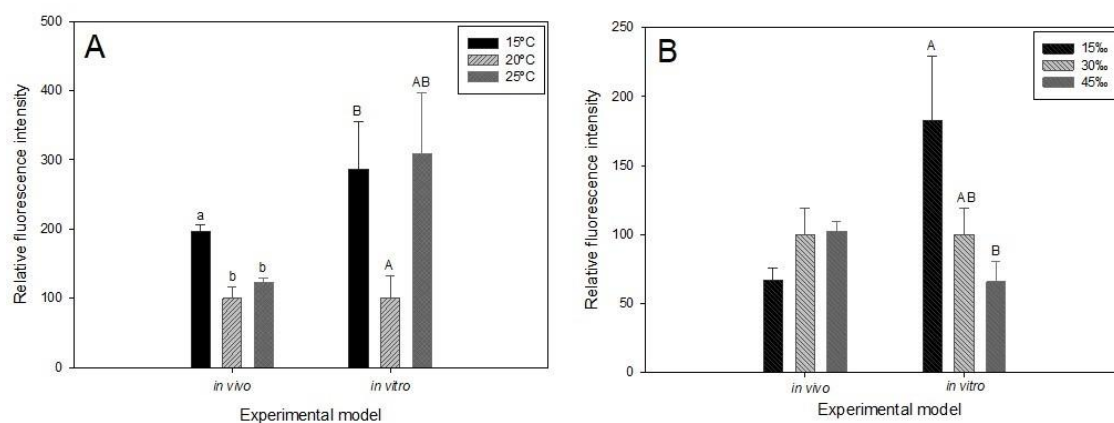


Figure 1: Relative MXR activity based on Rhodamine B accumulation in *B. cangicum*. Panel A: Animals (*in vivo*) and cells (*in vitro*) exposed to different temperatures without copper presence (n = 3-4; n = 9-11, respectively). Panel B: Animals and cells exposed to different salinities without copper presence (n = 3-4; n = 8-11, respectively). Different letters indicate difference between treatments. Values represent means  $\pm$  standard error. Lower case indicates differences *in vivo*, capital letter indicates differences *in vitro*, statistical analysis performed by ANOVA one-way.

### 3.2. Salinity effects on MXR activity

The results of MXR activity under a range of salinities were shown in figure 1B. We choose the salinity 30‰ as control salinity because the average recorded by Odebrecht and collaborators (2010) and Gouveia and collaborators (2015) in Cassino Beach. The salinity 15‰ is possible to occur after rain or in years with the phenomenon “*La Niña*” (Odebrecht et al., 2010), additionally, salinity 45‰ although difficult to occurs, is possible in tide pools, once of *B. cangicum* habitats’ place (Melo and Amaral, 2005). The *in vivo* exposure was shown to be less sensitive than *in vitro*, once that *in vivo* no statistical difference was shown. *In vitro* exposure showed that hypoosmotic and hyperosmotic saline did not modify the activity in relation to isosmotic saline, however, the MXR activity in those cells exposed to 15‰ was lower than those exposed to 45‰. Marin and collaborators (2005) raised the hypothesis that proteins related to MXR activity could be associated with cellular volume-sensitive chloride channels, and the activation of these channels might be activating the cellular defense. Additionally, the study of our laboratory has already shown that gills cells of *Amarilladesma mactroides* submitted to hypoosmotic challenge increased their MXR activity (Anjos et al., 2016), and although no statistic difference was found in *in vivo* exposure, the fluorescent accumulation in *Bunodosoma cangicum* submitted to hypoosmotic saline seems to be lower (suggesting an increase in activity). Besides, the animals exposed to hyperosmotic saline produced an extensive mucus’ layer, and the absence of alteration in MXR activity showed in hyperosmotic saline *in vivo* might be attributed to this mucus’ protection. This mucus production had already shown in *Bunodosoma caissarum* and *B. cangicum* in order to reduce water loss and minimize the contact with the stressful environment (Amado et al., 2011; Abujamara et al., 2014). In fact, this statement is supported by the analysis of tissue water content. As shown in figure 2A, the hyperosmotic saline did not reduce the tissue hydration of *B. cangicum* in *in vivo* exposures, while hypoosmotic saline increase the water content. The highest salinity seems to be very stressful for the animals, what induced them to produce the extensive mucus layer, what protected the animals against water loss and could minimize the energy

availability to MXR activity due to high cost of this protection, might explain the similar MXR activity in relation to those animals in 30‰. Amado et al. (2011) observed that sea anemones (*B. caissarum*) that produced mucus layer preventing moisture loss and kept size, while the specie that not produced this mucus (*Anemonia sargassensis*) dried and shrunk. In fact, we can corroborate this hypothesis about higher salinity and water content when we analyze the results found *in vitro* to cellular volume (figure 2B), when the cells did not have mucus protection their volume decreased and this will be discussed soon.

The *in vitro* exposure showed that cells in salinity 15‰ the MXR activity did not show the difference in relation to control, although it appears to be smaller than 30‰, and is statistically smaller than 45‰ (figure 1B). This result is contrary to results obtained for *A. mactroides* gill cells (Anjos et al., 2016), where the cells activated the cellular defense in the hypoosmotic challenge, however, the salinity used for mollusks cells was 20‰, and here the salinity was 15‰, but both experiments used as control the salinity 30‰. Additionally, the exposure time was also different, with the mollusks cells the authors used an exposure time of 5 hours, while with sea anemones cells the time was 24 hours. Moreover, Honorato and collaborators (2017) performed a study with tropical sea urchin coelomocytes (*Echinometra lucunter*), where they submitted the cells to hypo- and hyper- salinity for 4 hours and showed a result similar to found in this study, highlighting that osmotic solutions were 25‰ (hypoosmotic), 35‰ (control) and 45‰ (hyperosmotic). The hypoosmotic shock inhibited the MXR activity while the hyperosmotic induced the activity (Honorato et al., 2017). The authors related the result with other study involving plants submitted to saline stress, where the osmotic stress induce the ABC transporter related protein OpuA, that is involved with the osmo-protection and prevents cells damage against hyperosmotic challenge (Honorato et al., 2017). This protein OpuA is an ABC transporter that is activated by osmotic challenge and because of the similarity with others ABC proteins the authors (Honorato et al., 2017) connect them with MXR activity.

The absence of MXR activity variation in different salinities could be attributed to the inhabiting behavior of this specie, once *Bunodosoma cangicum* is an intertidal

animal that suffers constantly with osmotic changes in their environment. Benson-Rodenbough and Ellington (1982) analyzed a range of salinities that *Bunodosoma cavernata* tolerate and they found a large spectrum, where the animals could survive from 11 until 49‰. When they compared their results with other sea anemones species they came across with different values depending on the temperature, concluding that temperature at the salinity tolerance is determinant, and may influence the results. Also, as *B. cangicum* is a euryhaline specie, these animals could survive in different salinities and, because of this, we could not see difference in MXR activity. On the other hand, the temperature was more relevant to interfere on MXR, but the temperature during the salinities experiments was constant at 20°C. Thus, we could expect that salinities changes associated with temperatures range might produce another response in MXR activity, and maybe, it could be different if associated with different substances, but this should be tested.

Trying to better understand our responses the cellular volume was measured. Surprising, the cellular volume did not correspond to known usual response for osmotic shocks, where the hypoosmotic solution would carry to cellular swelling and hyperosmotic shock would carry to cellular shrinking (Hoffmann and Dunham, 1995; Lang et al., 1998). Here, both hypoosmotic and hyperosmotic saline carried the cells to shrink, in comparison to those in salinity 30‰ (control) (figure 2B). However, the exposure time was 24h, a relatively long time to responses in cellular volume that normally are measured in minutes after osmotic shocks (Amado et al., 2011; Morabito et al., 2013; Foguesatto et al., 2017). Possibly, this reduction in cellular volume result seems to be more related to cellular death activated by a long time under osmotic stress than volume regulation in fact, once in the apoptotic process the loss in cellular volume was recognized as a hallmark (apoptotic volume decreased) (Majno and Joris, 1995; Yu and Choi., 2000; Elmore, 2007).

In order to know if the osmotic challenge was being stressful for sea anemones cells, the cytotoxicity was measured based on viability and number of cells (figure 3). The viability decreased in those cells exposed to hyperosmotic saline; the cells in hypoosmotic saline had a viability similar to control (30‰) and 45‰ (figure 3A), while the number of cells did not show difference between



treatments (figure 3B). However, the number of the cells shows a visible tendency to decrease under hyperosmotic shock. So, in fact, the osmotic challenge is being a stress for sea anemones cells, mainly the hyperosmotic saline when the viability decreased. About the hypoosmotic saline, the cells seem to managing to deal with the challenge although the reduction of cellular volume. Amado and collaborators (2011) had already shown that isolated cells from sea anemone *B. caissarum* did not swell during 20 minutes under hypoosmotic shock or decreased their viability, however, the hyperosmotic shock shrunk the cells but not decreased the viability. Highlighting, the osmotic shocks used by Amado and collaborators were 20% for hypo- and 25% for hyperosmotic solution, while our shocks were 50% for both conditions. So, our result and the result with other *Bunodosoma* specie indicated that sea anemones cells could to deal with hypoosmotic challenge better than with hyperosmotic challenge.

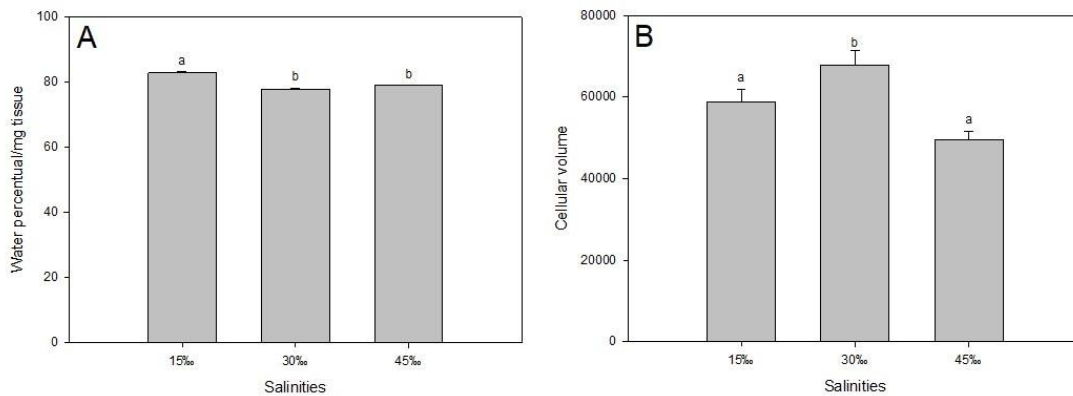


Figure 2: Hydration of *B. cangicum*. Panel A: Tissue water content of animals exposed *in vivo* to different salinities (n = 5). Panel B: Cellular volume of *in vitro* exposure to different salinities (n = 32-37). Values represent means  $\pm$  standard error. Different letters indicate difference between treatments, statistical analysis performed by ANOVA one-way.

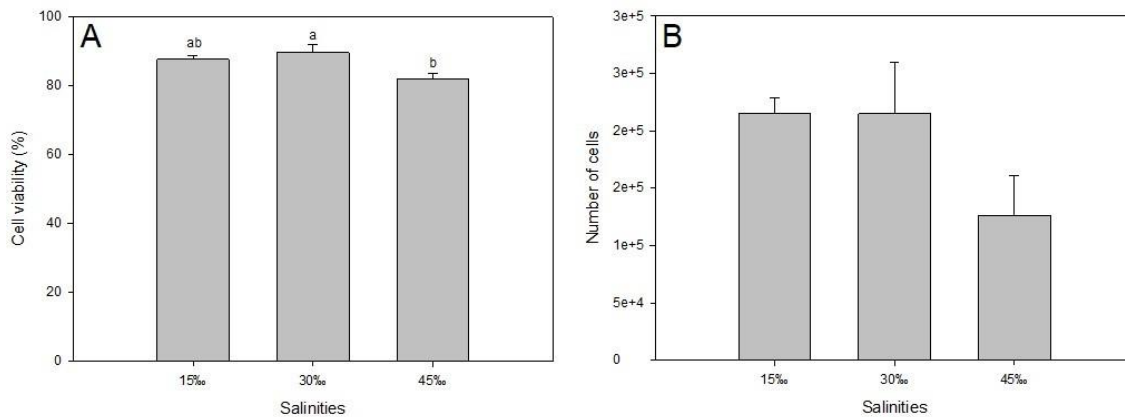


Figure 3: Toxicity in *B. cangicum* cells exposed *in vitro* to different salinities. Panel A: viability after 24h of exposure (n = 6). Panel B: number of cells remaining in each treatment (n = 3-4). Values represent means  $\pm$  standard error. Different letters indicate difference between treatments, statistical analysis performed by ANOVA one-way.

### 3.3. *In vivo* x *In vitro* exposures

Thus, linking the results we can conclude that hyperosmotic challenge is very stressful to animals and isolated cells, therefore the animals produce mucus in order to protect themselves, minimizing the interaction with the environment. Additionally, a hyperosmotic challenge as purposed in this study is difficult to found at literature, although for *B. cangicum* it could eventually be a reality and to know how these animals behave under this situation is relevant. About the temperature, the results were more similar between *in vitro* and *in vivo*, and show that low temperature could decrease the mechanism of defense. Although the main idea of *in vitro* technique is predicting the potential toxicity of chemicals *in vivo*, not necessarily they were correlated. However, the *in vitro* results have a great role to explain possible mechanism of chemicals toxicity (Garle et al., 1994; Wiesinger et al., 2012). Moreover, the uses of *in vitro* experiments are recommended to better understanding mechanistic responses and to predict future responses to organisms, once *in vivo* are better to understand the organic responses under stress conditions. Our results of hyperosmotic salinity corroborate this idea, where the animals produced mucus, protecting themselves from the external environment (at least

during 24 hours), while the cells exposed *in vitro* to same salinity did not show how protect themselves and suffered a decrease in viability.

#### 3.4. Temperature x copper in MXR activity

Analyzing the MXR activity with temperatures range in *in vivo* exposures (figure 4A), the smallest activity was shown in 7.8  $\mu\text{g Cu /L}$  at 20°C. At 7.8  $\mu\text{g Cu/L}$  the animals exposed to colder and warmer temperatures had MXR activity induced, in relation to those in control temperature (20°C). While those animals exposed to 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  in 15°C and 25°C the MXR activity was reduced in relation to those in control temperature. About MXR activity in *in vitro* exposure, the higher activity was shown in 7.8  $\mu\text{g Cu/L}$  at 15°C (figure 4B). With 7.8  $\mu\text{g Cu/L}$ , the activity was different for all temperatures, the lowest activity was exhibited in control temperature (20°C), the highest activity was seen in 15°C, and in 25°C had an intermediary activity. However, in those isolated cells exposed *in vitro* to higher copper concentration MXR activity did not modify, independently of temperature. The MXR activity under different temperatures in association with copper was not reported in the literature, and although this result is new, it was unexpected, as cited above, usually the literature reports that increase in temperature that increases activity. Probably the combination of two stressors was a major challenge than each factor individually. This statement could be confirmed with the result of the interaction (table 1). Based in the results, that showed interaction between the factors temperature and copper presence, the predicted effect was evaluated and compared with the observed effects (table 2), and using this results an interaction plot was generated (figure 5). Almost all the interactions effects were synergists, i.e., the observed effect was higher than the predicted effect, or in other words, the observed result was higher than the sum of the isolated factors (the predicted effect) (Crain et al., 2008). In fact, the literature studies that evaluated toxicity and metabolic responses with copper and temperature showed that combination of factors was more stressful than the factors by themselves (Bat et al., 2000; Rao and Khan, 2000; Fonseca et al., 2017). At the studies of Bat and collaborators (2000) and Rao and Khan (2000), they showed that higher temperatures increase the sensibility of diverse amphipods

species and mussels, respectively, to copper exposure, where the lethal concentration for 50% of the animals were half concentration necessary in the control temperature. Also, the temperature might cause remodeling of membrane lipid and differences on permeability (Hazel, 2995; Papina et al., 2007), which could interfere in metal uptake, increasing this, and, consequently, interfere in animals' sensibility. Although the higher temperature in copper presence did not modify the MXR activity is possible that the accumulation of the metal increase because the difference on membrane permeability. However, measuring the metal accumulation still necessary to prove this idea. About the metabolism, Fonseca and collaborators (2017) showed that increased temperature combined with copper exposure increased the susceptibility to bleaching of corals also reduced the growth, once the combined exposure compromises the calcification process and increased the oxidative stress. In general way, the temperature variation with the presence of 15.6 µg Cu/L did not alter the MXR activity, leading us to believe that copper in this concentration is more stressful than the temperature for sea anemones cells, and it is discussed in the next section.

Table 1: Summary of analysis of variance of analysis performed in *Bunodosoma cangicum*, both *in vivo* as *in vitro*, exposed to different temperature/salinity and copper (Cu) concentrations and the results of interactions (• significant statistically,  $p \leq 0,05$ ;  $\Delta$  non-significant,  $p \geq 0,05$ ).

Parameter		Temperature	Cu	Interaction T°C x Cu	Salinity	Interaction Sal x Cu
MXR activity	<i>in vivo</i>	$\Delta$	•	•		
MXR activity	<i>in vitro</i>	•	•	•		
MXR activity	<i>in vivo</i>		•		•	$\Delta$
MXR activity	<i>in vitro</i>		$\Delta$		•	$\Delta$
Tissue hydration	<i>in vivo</i>		•		•	$\Delta$
Cellular volume	<i>in vitro</i>		•		•	•
Viability	<i>in vitro</i>		•		$\Delta$	$\Delta$
Number of cells	<i>in vitro</i>		$\Delta$		•	$\Delta$

Table 2: Summary of interpretation of interactions (combined effect) of temperature and copper in *Bunodosoma cangicum*, both *in vivo* and *in vitro*, based on calculations of predicted effect and fraction changes compared with the control.

	Treatments		Observed effect compared with the control (0 µg Cu/L in	Predict effect	Combined effect
	Copper	Temperature			
<i>l</i> <i>n</i> <i>v</i> <i>i</i> <i>v</i> <i>o</i>	0	15	-	-	n.a.
	0	25	-	-	n.a.
	7	15	-0.559523757	-2.406110982	sinergic
	7	20	-	-	n.a.
	7	25	-0.609375892	-1.670853311	sinergic
	15	15	-0.759125384	-1.307028747	sinergic
	15	20	-	-	n.a.
	15	25	-0.934436849	-0.571771076	antagonist
<i>l</i> <i>n</i> <i>v</i> <i>i</i> <i>t</i> <i>r</i> <i>o</i>	0	15	-	-	n.a.
	0	25	-	-	n.a.
	7	15	0.813044449	-5.900007729	sinergic
	7	20	-	-	n.a.
	7	25	-0.803609472	-6.124913601	sinergic
	15	15	-2.585555119	-5.575911547	sinergic
	15	20	-	-	n.a.
	15	25	-3.465945543	-5.800817419	sinergic

n.a. denotes cases where only a single factor and not the interaction term were significant

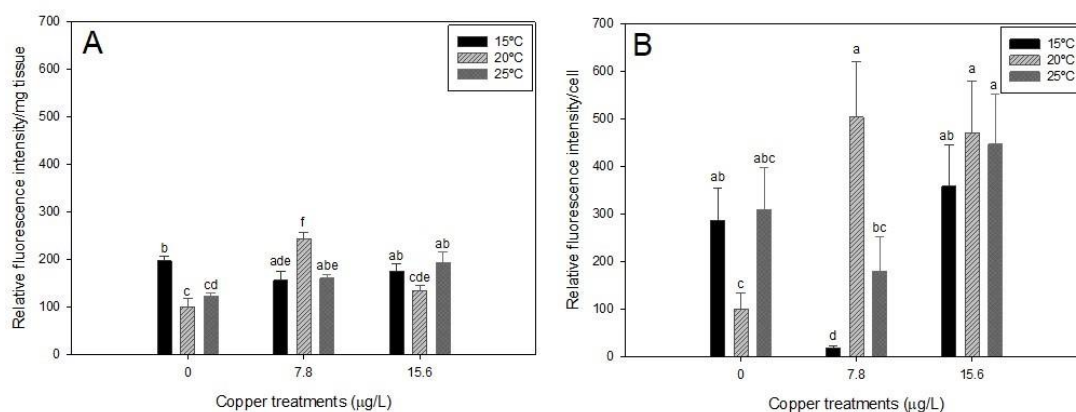


Figure 4: Relative MXR activity based on Rhodamine B accumulation in *B. cangicum*. Panel A: Animals exposed *in vivo* to different temperatures and copper concentrations (n = 3-4). Panel B: Cells exposed *in vitro* to different temperatures and copper concentrations (n = 9-12). Values represent means ± standard error. Different letters indicate difference between treatments, statistical analysis performed by ANOVA factorial.

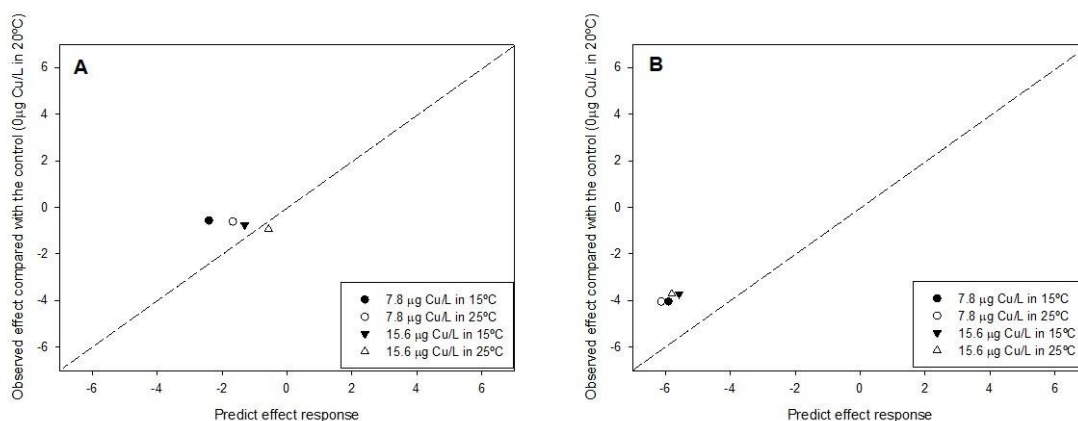


Figure 5: Interactive plots (observed  $\times$  predicted effect) representing the MXR activity of *Bunodosoma cangicum* in *in vivo* exposures (a) and *in vitro* exposures (b) to different combinations of copper concentrations and temperatures. Dotted line represents the zero-interaction line (additivity). Data points distributed *below* the zero-interaction line indicate antagonism (observed < predicted effect), while those distributed *above* this line indicate synergism (observed > predicted effect).

### 3.5. Salinity x copper in MXR activity

About salinity, either *in vivo* and *in vitro* did not show interaction between salinities and copper treatments (Table 1). The presence of copper did not alter the MXR activity either *in vivo* or *in vitro* (figure 6, panel A and B, respectively), the difference observed were the same showed for results of salinities alone, where the hypoosmotic shock decreased the MXR activity in relation to hyperosmotic shock in *in vitro* exposures, and that was commented above. However, the presence of metal seems to minimize the effect of salinity that was showed in the absence of copper, once all the treatments with copper in different salinities were similar. So, the copper presence stimulated the MXR activity in hypoosmotic shock in relation to hyperosmotic shock, because the inhibition that was showed with 0  $\mu\text{g Cu/L}$  disappeared. Remembering, the animals exposed to 45‰ showed a great mucus layer, also with copper presence... The parameters of viability and number of cells were analyzed also under copper treatments and the results were not different to those found just with osmotic challenge (data not shown), just the number of cells

had decreased in higher salinity and the presence of copper, indicating that this hyperosmotic shock associated with copper presence was more toxic for cells than these factors singly.

Furthermore, all results of MXR activity were not different when animals or cells were exposed to 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$ , independently of abiotic factor. Conversely, the methodology used to measure the MXR activity is based in the Rhodamine B accumulation, what is a substrate to ABC proteins and it is competing with the substrate tested, the copper. This way, is possible that an absence of difference in MXR activity in this copper concentration happened because a disbalanced efflux between the substrates, i.e., the MXR activity similar to control, could be because the copper efflux may be higher than Rhodamine B efflux, however, this last substrate is the dye used to measured (indirectly) the activity. Nonetheless, the copper at double concentration allowed by Brazilian legislation for this water class (sea water type II - recreational fishing and secondary contact recreation) seems to be the higher stress factor, independently of a possible error added by methodological artifact. Another study of our laboratory had already shown that this statement is true. Anjos and collaborators (2014) showed that this copper concentration (15.6  $\mu\text{g Cu/L}$ ) was cytotoxic for sea anemones *B. cangicum*, increasing the amount of reactive oxygen species and leading to DNA damage, and other recent study (Anjos et al, 2017) demonstrated that copper in the same concentration increased the metal accumulation and cytotoxicity in sea anemones cells. This same study also demonstrated that 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  decreased the ABC protein expression, where the hypothesis rises up was that metal could overwhelm the MXR system besides caused a disruption in protein functionality, as a result of several process, such increase of reactive oxygen species, damage in ABC proteins and conformational state which posterior hydrolysis. Therefore, the copper concentration of 15.6  $\mu\text{g Cu/L}$  should be considered as a stressful for sea anemones *Bunodosoma cangicum*.

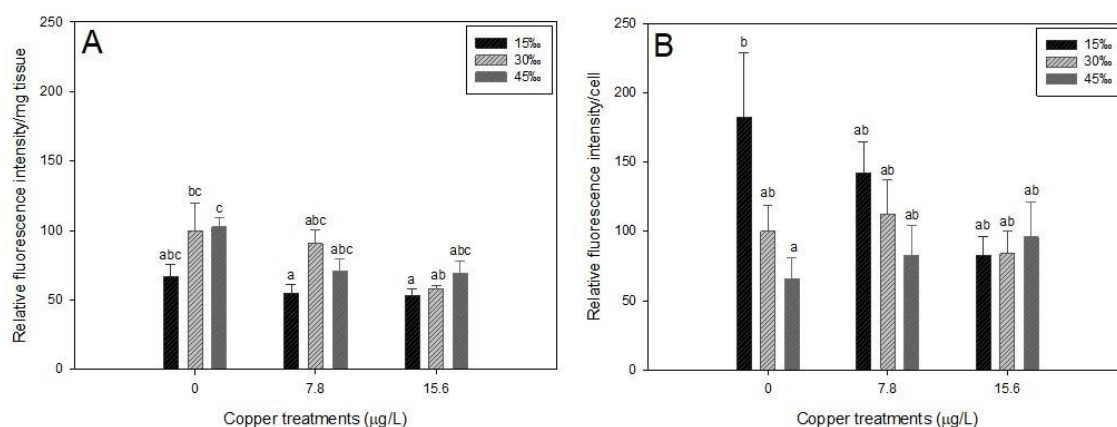


Figure 6: Relative MXR activity based on Rhodamine B accumulation in *B. cangicum*. Panel A: Animals exposed to different salinities and copper concentrations (n = 3-4). Panel B: Cells exposed to different salinities and copper concentrations (n = 8-13). Values represent means  $\pm$  standard error. Different letters indicate difference between treatments, statistical analysis performed by ANOVA factorial.

#### 4. CONCLUSION

Our results show that abiotic factors like temperature and salinity interfered in the response of MXR activity, independently of contamination presence, where the temperature had a more pronounced effect. Therefore, supporting the idea of Eufemia and Epel (2000) that suggest that MXR could be a general response to stress, the use of MXR activity as a biomarker of environmental contamination might be done carefully. Moreover, the different types of exposition produced different way to see the impact of the stress factor in sea anemones. The *in vivo* exposures inform about the whole animal response, where they produced a mucus layer protection, while *in vitro* permit to know more mechanistic response, where was possible to see the cellular viability decreased. Although these different expositions did not produce similar answers all the time, they are complementary.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

V.A. Anjos had support from CAPES – Brazil. This work had the financial support of the National Institute of Science and Technology in Aquatic Toxicology (INCT-TA, CNPq 573949/2008-5).



## REFERENCES

- Abujamara, L.D.; Prazeres, M.F.; Borges, V.D.; Bianchini, A. 2014. Influence of copper pre-exposure on biochemical responses of the sea anemone *Bunodosoma cangicum* to changes in oxygen availability. *Comp. Biochem. Physiol. C* 162, 34–42.
- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the asiatic clam *corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347–357.
- Amado, E.M.; Vidolin, D.; Freire, C.A.; Souza, M.M. 2011. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. *Comp. Biochem. Phys. C* 158, 542–551.
- Anjos, V.V, Siva-Jr, F.M.R., Souza, M.M. 2014. Cell damage induced by copper: an explant model to study anemone cells. *Toxicol. In Vitro*, 26, 365–372.
- Anjos, V.V., Galvão, J.S., Santos, V.R.S., Souza, M.M. 2016. *Amarilladesma mactroides* gill cells exposed to copper: Does hyposmotic saline increase cytotoxicity or cellular defenses? *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 609–613.
- Anjos, V.V.; Sandrini, J.Z.; Martinez, C.B.R.; Souza, M.M. 2017. Characterization of MXR activity in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* exposed to copper. *Comp. Biochem. Phys. C*, *in press*.
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 48, 357–389.
- Bat, L.; Akbulut M.; Ulha, M.; Çulha, M.; Gündoúdu, A.; Satilmiş, H.H. 2000. Effect of temperature on the toxicity of zinc, copper and lead to the freshwater amphipod *Gammarus pulex pulex* (L., 1758). *Turk J. Zool.* 24, 409–415.
- Benson-Rodenbough, B.; Ellington, W.R. 1988. Responses of the euryhaline sea anemone *Bunodosoma cavernata* (BOSC) (Anthozoa, Actinaria, Actiniidae) to osmotic stress. *Comp. Biochem. Physiol. A* 72, 731–735.
- Bliss, C.I. 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585–615.
- Cajaraville, M.P.; Bebbiano, M.J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C.; Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311.
- Clarke, A.; Fraser, K.P.P. 2004. Why does metabolism scale with temperature? *Funct. Ecol.* 18, 243–251.

Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA – Resolution Nº 357/2005, available in <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>, access in June 2017.

Crain, C.M.; Kroeker, K.; Halpern, B.S. 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecol. Lett.* 11, 1304–1315.

Cunha, V.; Burkhardt-Medicke, K.; Wellner, P.; Santos, M.M.; Moradas-Ferreira, P.; Luckenbach, T.; Ferreira, M. 2017. Effects of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on multixenobiotic resistance (MXR) related efflux transporter activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotox Environ Safe.* 136, 14–23.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.

Eufemia, N.A.; Epel, D. 2000. Induction of the Multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquat. Toxicol.* 49, 89–100.

Fernández-Sanjuan, M.; Faria, M.; Lacorte, S.; Barata, C. 2013. Bioaccumulation and effects of perfluorinated compounds (PFCs) in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2661–2669.

Ferreira, M.; Costa, J.; Reis-Henriques, M.A. 2014. ABC transporters in fish species: a review. *Front. Physiol.*, 5.

Foguesatto, K.; Boyle, R.T.; Rovani, M.T.; Freire, C.A.; Souza, M.M. 2017. Aquaporin in different moult stages of a freshwater decapod crustacean: expression and participation in muscle hydration control. *Comp. Biochem. Phys. A* 208, 61–69.

Fonseca, J.S.; Marangoni, L.F.B.; Marques, J.A.; Bianchini, A. 2017. Effects of increasing temperature alone and combined with copper exposure on biochemical and physiological parameters in the zooxanthellate scleractinian coral *Mussismilia hartii*. *Aquat. Toxicol.* 190, 121–132.

Garle, M.J.; Fentem, J.H.; Fry, J.R. 1994. *In vitro* cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. *Toxicol. In Vitro* 8, 1303–1312.

Gouveia, G.R.; Trindade, G.S.; Nery, L.E.M.; Muelbert, J.H. 2015. UVA and UVB penetration in the water column of a South West Atlantic warm temperate estuary and its effects in cells and fish larvae. *Estuaries and Coasts* 38, 1147–1162.

Hazel, J. R. 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57, 19-42.

Hoffmann, E.K.; Dunham P.B. 1995. Membrane mechanisms and intracellular signaling in cell volume regulation. In Kwang WJ, editor. *Int. Rev. Cytol.* 161, 172–262.

- Honorato, T.B.M.; Boni, R.; Silva, P.M.; Marques-Santos, L.F. 2017. Effects of salinity on the immune system cells of the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 486, 22–31.
- Jeong, C.; Kim, B.; Kim, R.; Park, H.G.; Lee, S.; Shin, K.; Leung, K.M.; Rhee, J.; Lee, J. 2014. Functional Characterization of P-Glycoprotein in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* and its potential role in remediating metal pollution. Aquat. Toxicol. 156, 135–147.
- Keppler, C.; Ringwood, A.H. 2001a. Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects. Aquat. Toxicol. 54, 195–204.
- Keppler, C.; Ringwood, A.H. 2001b. Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters, *Crassostrea virginica*. Mar. Environ. Res. 52, 81–96.
- Kingtong, S.; Chitramvong, Y.; Janvilisri, T. 2007. ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. Aquat. Toxicol. 85, 124–132.
- Kurelec, B.; Smital, T.; Pivčević, B.; Eufemia, N.; Epel, D. 2000. Multixenobiotic Resistance, P-Glycoprotein and chemosensitizers. Ecotoxicology 9, 307–327.
- Lang F.; Busch G.L.; Ritter M.; Völkl H.; Waldegger S.; Gulbins E.; Häussinger D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. Physiol. Rev. 78, 247-306.
- Luedeking, A.; Koehler, A. Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. Aquat. Toxicology, v. 69, pags. 1-10, 2004.
- Majno, G.; Joris, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. Am. J. Pathol. 146, 3–15.
- Marin, M.; Poret, A.; Maillet, G.; Leboulenger, F.; Le Foll, F. 2005. Regulation of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels in multi-drug resistant MCF7 cells. Biochem. Biophys. Res. Co. 334, 1266–1278.
- Melo, K.V., Amaral, F.D., 2005. Ampliação da distribuição das anêmonas-do-mar (Cnidaria, Actiniaria) no estado de Pernambuco. Brasil. Trop. Ocean. 33, 19–31.
- Minier, C.; Borghi, V.; Moore, M.N.; Porte, C. 2000. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 50, 167–176.
- Morabito, R.; Marino, A.; La Spada, G. 2013. Heavy metals affect regulatory volume decrease (RVD) in nematocytes isolated from the jellyfish *Pelagia noctiluca*. Comp. Biochem. Phys. A 165, 199–206.

- Odebrecht, C.; Bergesch, M.; Rörig, L.R.; Abreu, P.C. 2010. Phytoplankton interannual variability at Cassino Beach, Southern Brazil (1992-2007), with emphasis on the surf zone diatom *Asterionellopsis glacialis*. *Estuaries and Coasts* 33, 570–583.
- Oliveira, F.; Silva, S.M.C.P.; Martinez, C.B.R. 2014. Assessment of domestic landfill leachate toxicity to the Asian clam *Corbicula fluminea* via biomarkers. *Ecotox. Environ. Safe.* 103, 17–23.
- Pain, S.; Devin, S.; Parant, M. 2007. Biomarker versus environmental factors: seasonal variations and modelling multixenobiotic defence (MXD) transport activity in transplanted zebra mussels. *Sci. Total Environ.* 373, 103–112.
- Papina, M.; Meziane, T.; van Woesik, R. 2007. Acclimation effect on fatty acids of the coral *Montipora digitata* and its symbiotic algae. *Comp. Biochem. Physiol. B* 147, 583–589.
- Rao, D.G.P.; Khan, M.A. 2010. Zebra mussels: enhancement of copper toxicity by high temperature and its relationship with respiration and metabolism. *Water Environ. Res.* 72, 175–178.
- Rocha, C.T., Souza, M.M., 2012. The influence of lead on different proteins in gill cells from the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*, from defense to repair biomarkers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 56–67.
- Sokolova, I.M.; Lannig, G. 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.* 37, 181–201.
- Timofeyev, M.A.; Shatilina, Z.M.; Bedulina, D.S.; Menzel, R.; Steinberg, C.E.W. 2007. Natural organic matter (NOM) has the potential to modify the multixenobiotic resistance (MXR) activity in freshwater amphipods *Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*. *Comp. Biochem. Phys. B* 146, 496–503.
- Walker, C.H.; Hopkin, S.P.; Sibly, R.M.; Peakall, D.B. 2001. Principles of Ecotoxicology. 2<sup>nd</sup> ed. Taylor & Francis Inc., New York, EUA. 309 pp.
- Wiesinger, M.; Mayer, B.; Jennings, P.; Lukas, A. 2012. Comparative analysis of perturbed molecular pathways identified in *in vitro* and *in vivo* toxicology studies. *Toxicol. In Vitro* 26, 956–962.
- Yu, S.P.; Choi, D.W. 2000. Ions, cell volume, and apoptosis. *PNAS* 97, 9360–9362.

## DISCUSSÃO GERAL

O ambiente aquático sofre cada vez mais com a poluição ambiental, causada em sua maioria por ações antrópicas. Os animais que vivem nestes ambientes precisam, por sua vez, de estratégias que visem minimizar os possíveis danos que estes poluentes possam causar (Moore et al., 2004). Essas estratégias, muitas vezes, incluem formas de eliminação dessas substâncias, como podemos exemplificar através do fenótipo MXR, conferido por algumas proteínas da família ABC que têm a capacidade de colocar para fora das células os agentes tóxicos com gasto de energia (Bard, 2000; Jeong et al., 2017). Nos últimos anos vêm crescendo a análise deste fenótipo como um biomarcador de defesa celular, mas apesar disso, o conhecimento que existe sobre a sua relação direta com a acumulação dos agentes tóxicos e também em como o próprio ambiente pode vir a interferir nessas proteínas ainda é escasso. Por isso, o presente estudo teve por objetivo central relacionar a atividade dessas proteínas com a bioacumulação do cobre e também avaliar a resposta dessas proteínas em variações de temperatura e salinidade associado à exposição ao metal.

No primeiro trabalho da tese, foi possível alcançar o objetivo de relacionar o fenótipo MXR, através da atividade das proteínas, com a acumulação do metal, mostrando que essa pode ser uma via de efluxo de cobre. Alguns trabalhos na literatura já haviam mostrado que o cobre é um substrato para estas proteínas, entretanto, apenas o estudo de Jeong e colaboradores (2014) mostrou que quando as proteínas ABC encontram-se inibidas, aumenta o acúmulo de metais (cobre, zinco e cádmio) nos copépodes *Tigriopus japonicus*. O artigo apresentado aqui parece ser o primeiro relato dessa relação para cnidários, e também um dos poucos *in vitro* que possui abordagem ecotoxicológica. No geral, os trabalhos *in vitro* que relacionam bioacumulação e atividade dessas proteínas são encontrados em estudos relacionados ao câncer, onde os autores buscam quimioterápicos que consigam permanecer dentro das células e assim causar toxicidade às células tumorais (Robey et al., 2008; Assanhou et al., 2015; Hu et al., 2015).

Já no segundo trabalho da tese buscou-se analisar se as variações abióticas de temperatura e salinidade poderiam interferir na atividade MXR. Foi observado que estes fatores podem alterar a atividade das proteínas ABC, sendo que a temperatura se mostrou ser um fator bem mais crítico que a salinidade. É possível que a salinidade não tenha influenciado a atividade MXR devido à característica eurialina das anêmonas *Bunodosoma cangicum*. Animais que habitam zonas intermarés têm necessidade desta característica, uma vez que estes ambientes naturalmente sofrem grandes variações de salinidade. Já a análise da atividade MXR frente às variações de temperatura associada à presença de cobre, até onde se tem conhecimento, é inédita na literatura e os resultados mostraram que este biomarcador é bastante sensível à variação térmica. Alterações em atividades metabólicas relacionadas à temperatura já são conhecidas na literatura, e, normalmente, um aumento na temperatura leva a um aumento de atividade (Rao e Khan, 2000; Sokolova e Lannig, 2008). Justamente esse conhecimento acerca da interferência das variações térmicas sobre as atividades proteicas é que incitaram a dúvida de como a atividade MXR responderia, ainda mais frente à combinação dos fatores. Apesar de não ser observado um aumento na atividade (em relação à temperatura controle) com um aumento da temperatura, foi evidenciado que a diminuição da temperatura diminui a atividade. As anêmonas já são animais de metabolismo baixo, e é possível que o decréscimo na temperatura o tenha diminuído ainda mais, levando a uma minimização da produção de energia, e conseqüentemente, a uma menor atividade MXR. Esse resultado nos mostra que as anêmonas do mar *B. cangicum* podem estar mais sensíveis a possíveis poluições ambientais durante o inverno. Além disso, a interferência que a temperatura pode causar sobre a atividade MXR alerta para um maior cuidado ao testar novas substâncias como substratos para essas proteínas, pois alterações térmicas durante os experimentos podem levar a equívocos quanto ao efeito sobre a atividade proteica. Como já havia sido destacado por Eufemia e Epel (2000), a atividade MXR pode alterar de maneira genérica ao estresse e seu uso como biomarcador deve ser cuidadoso.

A atividade MXR na presença de cobre foi mensurada nos dois trabalhos da presente tese. De maneira geral, aquelas células expostas à menor concentração de cobre tiveram sua atividade reduzida em comparação ao controle, enquanto que a maior concentração de cobre não levou à alteração na atividade em relação àquelas com 0 µg Cu/L. Mas é importante destacar que independente de aumentar ou não a atividade MXR, estas células possuem esse sistema de defesa e ele é efetivo em realizar a efluxo do metal. O resultado encontrado nas células e animais expostos a 15,6 µg Cu/L foi discutido nos dois trabalhos, pois acredita-se que essa concentração de cobre sature esse sistema de defesa das anêmonas. O cobre é um metal essencial, portanto os animais possuem mecanismos de captação deste metal para a manutenção dos níveis adequados, entretanto, quando as concentrações ultrapassam os limites saudáveis este passa a ser tóxico. Para que o limite não ultrapasse, os animais possuem sistemas de controle homeostático delicado, que incluem mecanismos de estocagem (que visam diminuir a biodisponibilidade) e eliminação (Grosell, 2012). Como foi evidenciado no primeiro trabalho da tese, uma das vias de eliminação é através das proteínas ABC, entretanto, essas possuem uma capacidade limite, e por isso, considera-se que nesta concentração mais alta o mecanismo esteja saturado. Juntando-se os resultados obtidos com os trabalhos realizados nesta tese com um resultado previamente obtido (Anjos et al., 2014), vê-se que o dobro da concentração de cobre permitida pela legislação brasileira para águas salinas de classe II é bastante desafiador para as anêmonas, pois leva a um aumento de espécies reativas de oxigênio, dano ao DNA, diminuição das proteínas ABC alocadas na membrana plasmática e morte celular. O cobre já é conhecido por aumentar a quantidade de espécies reativas de oxigênio, danos moleculares e também por interagir com proteínas prejudicando sua funcionalidade, sendo que a concentração de exposição necessária para estas alterações varia entre as espécies (revisões de Grosell, 2012; Tamás et al., 2014).

O meio em que essa exposição ocorre, como as características químicas da água, presença de matéria orgânica, pH e a temperatura interferem na toxicidade que o cobre pode apresentar (Bianchini et al., 2004; Grosell, 2012). Estudos

envolvendo cobre e diferentes salinidades são bastante recorrentes na literatura, uma vez que este metal possui a capacidade de interagir ou competir com os demais componentes presentes no ambiente aquático, apresentando diferentes toxicidades nos variados grupos animais (Jones et al., 1976; Anderson et al., 1995; Blanchard e Grosell, 2005; Lee et al., 2010, Monteiro et al., 2013). Geralmente menores salinidades levam a maior toxicidade do metal, entretanto, algumas vezes ocorre o oposto, como visto por Anjos e colaboradores (2016), em que a menor salinidade levou às células de mariscos *Amarilladesma mactroides* a apresentarem a maior atividade MXR e menor citotoxicidade. Este resultado pode ser explicado pela ideia proposta por Grosell e colaboradores (2007) que diz que a fisiologia dos animais é muito mais importante para a toxicidade do que a geoquímica do metal, onde os autores levantam as hipóteses de que o tamanho do animal, estágio de desenvolvimento e também variações em parâmetros como trocas gasosas, balanço ácido-básico e excreção de amônia, podem levar a variações na sensibilidade dos animais. Durante todos os experimentos da tese, procurou-se utilizar animais do mesmo tamanho (sugerindo também mesma idade), que estivessem com períodos de aclimação semelhantes, e no caso das experimentações *in vitro*, com o mesmo número de explantes removidos; cuidados estes tomados com o intuito de diminuir possíveis interferentes fisiológicos nas respostas obtidas.

Ainda no segundo trabalho desta tese, foi avaliada a atividade MXR frente às diferentes salinidades associado à presença de cobre e notou-se que não houve diferença entre os tratamentos. Este resultado foi surpreendente, uma vez que seria esperado que as diferentes salinidades na presença do metal levassem as células e/ou os animais a diferentes respostas na atividade MXR. Entretanto, foi possível ver que tanto as células quanto os animais tiveram maneiras diferentes de lidar com a combinação dos estressores. Os animais expostos à salinidade mais alta (45‰) produziram uma camada de muco bastante densa que os protegeu do ambiente, o que pode explicar a ausência de diferença nos resultados de atividade MXR e hidratação tecidual. Já aqueles animais na salinidade 15‰ não produziram uma camada densa de muco (o muco produzido foi semelhante aqueles animais em



tratamentos controle), ficando expostos ao choque osmótico e também ao metal presente na água. Além disso, é possível que ausência de mudanças na atividade ou até mesmo inibições vistas na atividade MXR possam vir a ser artefatos da metodologia utilizada para mensurar a atividade. O método baseia-se no acúmulo de substrato fluorescente, que pode competir com o substrato testado, neste caso, o cobre. Portanto, caso as células estejam transportando de maneira desbalanceada a rodamina B – que é o substrato visível e utilizado para mensurar a resposta, podem ser embutidos ruídos na avaliação da atividade.

Além dos resultados apresentados no manuscrito com as variações de salinidade, a hidratação tecidual e volume celular também foram mensurados na presença do metal e estes resultados são apresentados na figura 6, entretanto optou-se por não incluí-los no manuscrito por não ser o foco daquele trabalho. Apesar da atividade MXR não ter sido diferente nas exposições *in vivo*, a hidratação tecidual aumentou no choque hiposmótico e, de forma mais pronunciada, naqueles animais que foram expostos ao cobre (figura 6A). É possível que esse aumento na hidratação tecidual tenha diluído um pouco da concentração de rodamina B, deixando os tratamentos hiposmóticos com uma leve redução na quantidade de fluorescente, entretanto, como esse aumento na quantidade de água nos organismos não foi grande, apesar de significativo (6% na ausência de cobre e cerca de 10% na presença do metal), não foi vista diferença estatística para a atividade MXR entre os tratamentos. Já é sabido que este metal possui a capacidade de interferir na regulação de volume, interferindo na homeostase do cálcio, que possui papel central na regulação e controle do volume celular (Wong e Chase Jr., 1986; Blanchard e Grosell, 2006; Lee et al., 2010; Grosell, 2012). Nota-se que analisando o volume celular (experimentos realizados *in vitro*, figura 6B), o choque hiposmótico levou ao decréscimo do volume em relação ao controle, entretanto, quando foi associada à exposição ao cobre, houve redução ainda maior naquelas células em salinidade 15‰ em ambas as concentrações de metal, confirmando a ideia de que o cobre causa disfunção no controle osmótico. Além disso, como foi discutido no primeiro artigo da tese, a presença do cobre constitui um gasto energético extra, levando as células a ter menos energia para processos

regulatórios de volume. Por sua vez, o choque hiperosmótico *per se* foi um estresse forte, conforme discutido no segundo trabalho. Associando-se a esta condição estressante o cobre, notou-se que as células tiveram ainda mais dificuldade em lidar com a situação, uma vez que a associação ao cobre levou à diminuição do número de células apenas nestas condições (dados não mostrados). Já *in vivo*, por haverem produzido uma densa camada de muco, as anêmonas conseguiram se proteger deste estresse, não havendo perda hídrica nem na presença do metal (em relação a salinidade 30 ‰). Dessa forma, pode-se concluir que um choque hiperosmótico dessa magnitude (45‰) associado ao contaminante é um grande desafio para os animais, que despendem um grande gasto energético a fim de produzir a camada protetora de muco, entretanto, é um meio eficaz em manter o animal isolado do ambiente, pelo menos, por 24 horas. A diferença entre as respostas obtidas nas exposições *in vivo* e *in vitro* salientam a importância da metodologia aplicada para a avaliação dos resultados. Como foi visto, quando utilizado a célula isoladamente nota-se melhor a sensibilidade do modelo frente ao estressor, entretanto, a exposição de todo organismo fornece respostas de como este lida com o estresse em questão.

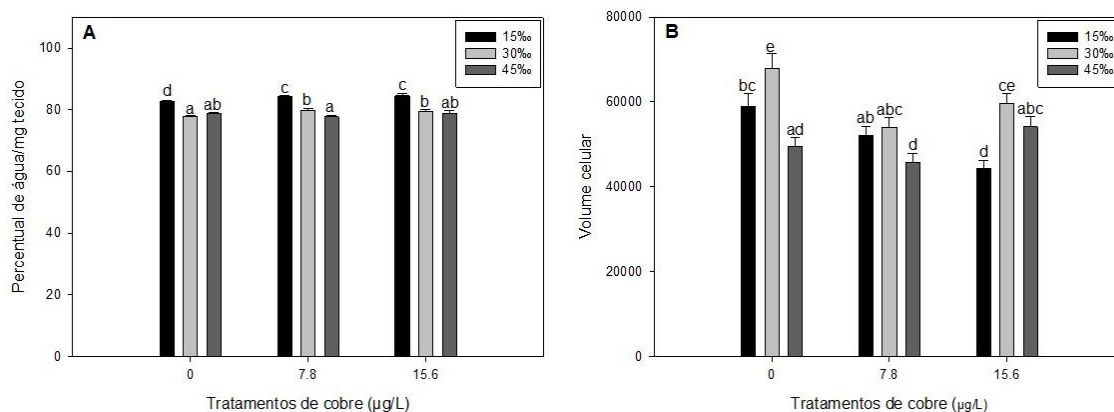


Figura 5: Hidratação das anêmonas do mar *Bunodosoma cangicum*. Painel A: Percentual de água da exposição *in vivo* a diferentes salinidades e concentrações de cobre. Painel B: Volume celular da exposição *in vitro* a diferentes salinidades e concentrações de cobre.

Como discutido acima, o modelo biológico utilizado é bastante importante, e diferentes grupos taxonômicos podem responder de diferentes formas aos parâmetros avaliados. A anêmona do mar *Bunodosoma cangicum* é um modelo biológico fácil de trabalhar, de fácil coleta e adapta-se bem ao ambiente laboratorial, podendo permanecer em aquários por longos períodos. Além disso, o desenvolvimento da cultura primária das células destes animais permite que sejam feitas análises *in vitro* de diversos parâmetros. Apesar das vantagens apresentadas, este modelo ainda é pouco utilizado em análises fisiológicas, bem como o uso de cnidários no geral. O filo Cnidaria recentemente vem tendo destaque em estudos ecotoxicológicos devido aos corais, a fim de descobrir como os efeitos do aquecimento global estão afetando estes organismos (Fonseca et al., 2017; Marangoni et al., 2017), entretanto, as anêmonas e demais organismos pertencentes ao filo seguem com pouco destaque na literatura. Como foi salientado na introdução desta tese, a maior parte dos trabalhos que utilizam as anêmonas do mar, especialmente a *Bunodosoma cangicum*, estão focados na função das toxinas presentes nestes animais (Treptow et al., 2003; Cunha et al., 2005; Zaharenko et al., 2008a; Zaharenko et al., 2008b; Oliveira et al., 2012; Stas et al., 2013; Bastos Jr. et al., 2016). Conhecer melhor a fisiologia destes organismos é fundamental para que consiga entender como estes organismos habitam locais com tantas variações (as regiões intermarés) e também para prever como os impactos antrópicos podem agir sobre estes animais.

Além disso, o uso da atividade MXR como um biomarcador, conforme comentado na introdução, é bastante comum, entretanto, deve-se destacar a importância de ampliar o conhecimento acerca de como cada modelo animal reage frente à exposição aos contaminantes e também conhecer a taxa basal de atividade em determinada condição ambiental, a fim de evitar más interpretações. Como ficou demonstrado neste trabalho, não é apenas a presença do agente tóxico que interfere na atividade MXR. Além disso, destaca-se que as respostas obtidas não são as mesmas para os variados animais, ficando difícil traçar um padrão. Por exemplo, Rocha e Souza (2012) haviam mostrado que existe um aumento na expressão de proteínas ABC na membrana de células branquiais de *Corbicula*

*fluminea* expostas ao chumbo nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{M}$ . Achard e colaboradores (2004) também encontraram um aumento da expressão proteica em células branquiais de *Corbicula fluminea* expostos a diferentes metais, incluindo cádmio (30  $\mu\text{g/L}$ ) e cobre (40  $\mu\text{g/L}$ ). Entretanto, as células de anêmonas apresentaram uma redução na quantidade de proteínas quando expostas à maior concentração de cobre (15,6  $\mu\text{g/L}$ ). Portanto, é indicado parcimônia ao sugerir que certo agente tóxico cause um determinado efeito sobre as proteínas ABC, generalizando para todos os animais, ou ainda que a alteração é causada por um único poluente.

Abaixo é apresentado um resumo gráfico dos pontos principais da presente tese, que teve seus dois objetivos principais alcançados com sucesso, sendo eles caracterizar o fenótipo MXR em células de anêmonas frente à exposição ao cobre e alertar para a influência do ambiente sobre a atividade das proteínas que possuem o fenótipo. Destaca-se na parte superior da imagem os resultados obtidos no primeiro artigo da tese, em que ficou evidente que as proteínas ABC são uma via para a saída do cobre, pois uma vez que essas são bloqueadas, há um maior acúmulo do metal, o que aumenta a citotoxicidade e leva a consequente morte celular. No meio da imagem, são mostrados os resultados encontrados para a temperatura, que age sobre a atividade MXR, diminuindo-a em baixa temperatura. Já na presença do metal, a atividade é diferente, podendo ser ativada ou inibida conforme a combinação dos estressores. Por fim, são mostrados os resultados quanto à salinidade. Quanto à atividade MXR, não foi vista houve alteração nos tratamentos com variação de salinidade em relação ao grupo controle, nem quando o metal foi associado. Entretanto, na variação de salinidade evidenciou-se as diferenças entre os modelos de exposição *in vivo* e *in vitro*, mas que levou à conclusão de que a alta salinidade (45‰) é um estressor maior que baixa salinidade e/ou exposição ao metal para as anêmonas *B. cangicum*.

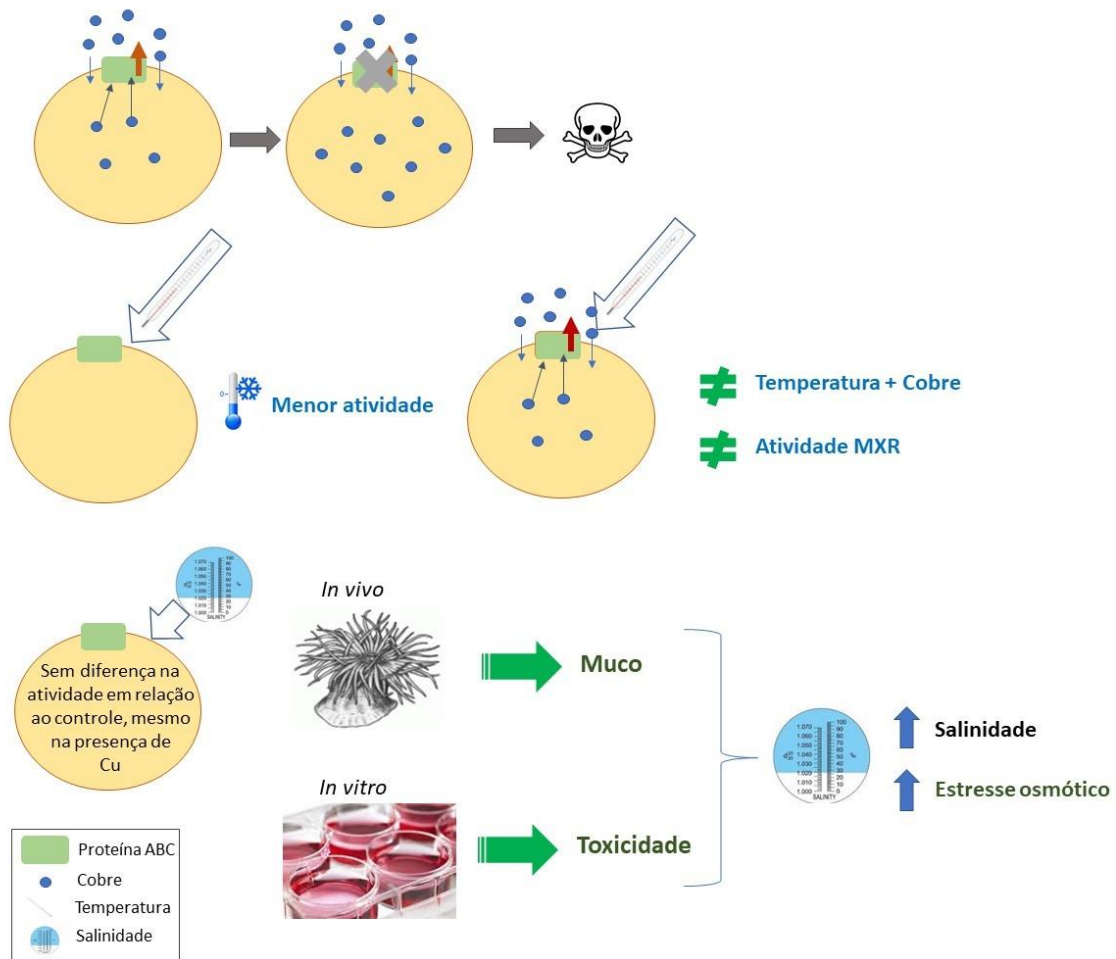


Figura 6: Resumo gráfico da atividade MXR obtida nos diferentes experimentos realizados na presente tese, demonstrando que as proteínas ABC são uma via de efluxo de cobre e como os fatores abióticos de temperatura e salinidade agem sobre a atividade proteica.

## CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho mostra as proteínas ABC podem ser uma via de saída do cobre nas células de anêmonas do mar *Bunodosoma cangicum*, mostrando que a inibição da atividade MXR leva a maior bioacumulação do metal, causando morte celular. Além da importância da caracterização do fenótipo MXR, este trabalho avaliou a interferência dos fatores abióticos sobre a atividade das proteínas ABC. Mostrou-se que a temperatura tem um papel crucial sobre a atividade destas proteínas, e que a adição do cobre gera uma resposta diferente daquela vista apenas frente ao fator abiótico. Já a salinidade revelou-se menos interferente na atividade MXR, mesmo na presença do cobre. Entretanto, constatou-se que o choque hiperosmótico, como proposto neste trabalho, é bem mais desafiador para as anêmonas-do-mar que o choque hiposmótico, levando-as, *in vivo*, a uma alta produção de muco para tentar minimizar o contato com o ambiente, enquanto que *in vitro* as células tiveram sua viabilidade comprometida. Com base nessa resposta, podemos concluir que tanto os estudos com exposições *in vivo* quanto *in vitro* são importantes para o desenho de um panorama completo de respostas, uma vez que o estudo *in vitro* permite uma melhor visualização dos mecanismos por trás das respostas e o estudo *in vivo* proporciona uma resposta sistêmica.

## PERSPECTIVAS

A atividade MXR, e as proteínas ABC em geral (tanto expressão proteica quanto gênica), são um largo campo de investigação uma vez que diversos agentes tóxicos podem ser explorados, diversas concentrações e muitos organismos. Acredita-se que um ponto fundamental a ser explorado é a interferência dos fatores abióticos, não apenas salinidade e temperatura, mas também disponibilidade de oxigênio, pH, radiação UV, entre outros. A utilização de diversos modelos animais também é importante, pois como mostrado, é possível que em animais eurialinos a variação de salinidade não interfira tanto quanto em animais estenoalinos. Instiga-se também o desenvolvimento de novos projetos que visem estabelecer uma relação entre as proteínas ABC e as proteínas de choque térmico, a fim de descobrir se há uma relação direta entre as atividades destas, corroborando para a ideia de que elas responderiam de maneira generalizada ao estresse.

Também é necessário mostrar que as proteínas ABC são vias de eliminação de diversas substâncias, através da utilização de bloqueadores específicos e avaliação do conteúdo intracelular das substâncias testadas. Quando analisados metais, sugere-se que além do uso dos bloqueadores já conhecidos, sejam testados outros bloqueadores de canais de cálcio, a fim de descartar a possível utilização destes canais para eliminação dos substratos. Além disso, estimula-se avaliar o possível efeito competidor entre o substrato fluorescente utilizado para mensurar (indiretamente) a atividade MXR e o substrato testado.

Dessa forma, para uma utilização mais segura da atividade MXR como biomarcador de contaminação ambiental é necessário que mais estudos sejam realizados utilizando fatores abióticos associados a agentes tóxicos em diversos modelos animais, para conhecer a resposta frente apenas ao ambiente e como esta ocorre com a interferência de uma substância estranha. Além disso, sempre que possível, é importante diferenciar as isoformas de ABC que estão sendo investigadas, uma vez que elas podem ter maiores/menores participações no transporte de determinados substratos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Abujamara, L.D.; Prazeres, M.F.; Borges, V.D.; Bianchini, A. Influence of copper pre-exposure on biochemical responses of the sea anemone *Bunodosoma cangicum* to changes in oxygen availability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 162, p. 34-42, 2014.

Achard, M.; Baudrimont, M.; Boudou, A.; Bourdineaud, J.P. Induction of a Multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicology*, v. 67, p. 347-357, 2004.

Alsop, D.; Wood, C.M. Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: common mechanisms across multiple metals. *Aquatic Toxicology*, v. 105, p. 385-393, 2011.

Amé, M.V.; Baroni, M.V.; Galanti, L.N.; Bocco, J.L.; Wunderlin, D.A. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere*, v. 74, p. 1179-1186, 2009.

Anderson, B.S.; Hunt, J.W.; Piekarski, W.J.; Phillips, B.M.; Englund, M.A.; Tjeerdema, R.S.; Goetzl, J.D. Influence of salinity on copper and azide toxicity to larval topsmelt *Atherinops affinis* (Ayres). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 29, p. 366-372, 1995.

Anjos, V.A.; Galvão, J.S.; Santos, V.R.S.; Souza, M.M. Hyposmotic saline increase cytotoxicity or cellular defenses? *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 97, p. 609-613, 2016.

Anjos, V.A.; Silva-Junior, F.M.R.; Souza, M.M. Cell damage induced by copper: an explant model to study anemone cells. *Toxicology in Vitro*, v. 28, p. 365-372, 2014.

Annilo, T.; Chen, Z.; Shulenin, S.; Costantino, J.; Thomas, L.; Lou, H.; Stefanov, S.; Dean, M. Evolution of vertebrate ABC gene family: Analysis of gene birth and death. *Genomics*, v. 88, p. 1-11, 2006.

Arciello, M.; Rotilio, G.; Rossi, L. Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 327, p. 454-459, 2005.

Assanhou, A.G.; Li, W.; Zhang, L.; Xue, L.; Kong, L.; Sun, H.; Mo, R.; Zhang, C. Reversal of multidrug resistance by co-delivery of paclitaxel and lonidamine using a TPGS and hyaluronic acid dual-functionalized liposome for cancer treatment. *Biomaterials*, v. 73, p. 284-295, 2015.

Balamurugan, K.; Schaffner, W. Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1763, p. 737-746, 2006.



Barbosa, F.G. Variações espaciais e temporais de nutrientes dissolvidos e metais traço na área portuária da cidade de Rio Grande (Estuário Lagoa dos Patos – RS). Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Oceanografia Física, Química e Geológica da Universidade Federal do Rio Grande. 2006, 49 p.

Barbosa, F.G.; Wallner-Kersanach, M.; Baumgarten, M.G.Z. Metais traço nas águas portuárias do estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, v. 16, p. 27-36, 2012.

Bard, S.M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, v. 48, p. 357-389, 2000.

Bastos Jr.; Varela Jr.; Ferreira, S.P.; Nornberg, B.F.; Boyle, R.T. Who knows not where an anemone does wear his sting? Could polypeptides released from the columnar vesicles of *Bunodosoma cangicum* induce apoptosis in the ZF-L cell line? *Toxicol*, v. 124, p. 73-82, 2016.

Bianchini, A.; Martins, S.E.G.; Barcarolli, I.F. Mechanism of acute copper toxicity in euryhaline crustaceans: implications for the Biotic Ligand Model. *International Congress Series*, v. 1272, p. 189-194, 2004.

Biscéré, T.; Lorrain, A.; Rodolfo-Metalpa, R.; Gilbert, A.; Wright, A.; Devissi, C.; Peignon, C.; Farman, R.; Duveilbourg, E.; Payn, C.; Houlbrèque, F. Nickel and ocean warming affect scleractinian coral growth. *Marine Pollution Bulletin*, v. 120, p. 250-258, 2017.

Blanchard, J.; Grosell, M. Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish *Fundulus heteroclitus*: Is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities? *Aquatic Toxicology*, v. 80, p. 131-139, 2006.

Blanchard, J.; Grosell, M. Effects of salinity on copper accumulation in the common killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, p. 1403-1413, 2005.

Bonnafé, E.; Sroda, S.; Budzinski, H.; Valière, A.; Pedelluc, J.; Marty, P.; Geret, F. Responses of cytochrome P450, GST, and MXR in the mollusk *Corbicula fluminea* to the exposure to hospital wastewater effluents. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 14, p. 11033-11046, 2015.

Bošnjak, I.; Hrabar, J.; Petrić.; Lušić, J.; Šver, L.; Mladineo, I. Multixenobiotic resistance mechanism in gills of reared vs. wild Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Water Air and Soil Pollution*, v. 225, p. 2073-2086, 2014.

Bošnjak, I.; Zaja, R.; Klob-Učar.; Šver, L.; Franekić, J.; Smital, T. Identification of ABC transporter genes in gonad tissue of two Mediterranean sea urchin species: Black, *Arbacia lixula* L., and Rocky, *Paracentrotus lividus* L. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 91, p. 415-419, 2013.

Bowen, P.K.; Drelich, J.; Goldman, J. A new *in vitro-in vivo* correlation for bioabsorbable magnesium stents from mechanical behavior. Materials Science and Engineering C, v. 33, p. 5064-5070, 2013.

Brusca, R.C.; Brusca, G.J. Invertebrados. 2ª ed. Guanabara Koogan. 968p. 2007.

Cajaraville, M.P.; Bebbiano, M.J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C.; Viarengo, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Science of the Total Environment, v. 247, p. 295-311, 2000.

Campos, B.; Altenburger, R.; Gómez, C.; Lacorte, S.; Piña, B.; Barata, C.; Luckenbach, T. First evidence for toxic defense based on the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology, v. 148, p. 139-151, 2014.

Choi, Y.H.; Yu, A.M. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. Current Pharmaceutical Design, v. 20, p. 793-807, 2014.

Costa, L.F.; Mirlean, N.; Wasserman, J.C.; Wallner-Kersanach, M. Variability of labile metals in estuarine sediments in areas under the influence of antifouling paints, southern Brazil. Environmental Earth Sciences, v. 75, p. 580-591, 2016.

Costa, L.F.; Wallner-Kersanach, M. Assessment of the labile fractions of copper and zinc in marinas and port areas in Southern Brazil. Environmental Monitoring and Assessment, v. 185, p. 6767-6781, 2013.

Cunha, R.B.; Santana, A.N.C.; Amaral, P.C.; Carvalho, M.D.F.; Carvalho, D.M.F.; Cavalheiro, E.A.; Maignet, B.; Ricart, C.A.O.; Cardi, B.A. Primary structure, behavioral and electroencephalographic effects of an epileptogenic peptide from the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. Toxicon, v. 45, p. 207-217, 2005.

Cunha, V.; Burkhardt-Medicke, K.; Wellner, P.; Santos, M.M.; Moradas-Ferreira, P.; Luckenbach, T.; Ferreira, M. Effects of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on multixenobiotic resistance (MXR) related efflux transporter activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 136, p. 14-23, 2017.

Della Torre, C.; Bocci, E.; Focardi, S.; Corsi, I. Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Marine Environmental Research*, v. 93, p. 56-63, 2014.

Della Torre, C.; Zaja, R.; Loncar, J. Smital, T.; Focardi, S. Interaction of ABC transporter proteins with toxic metals at the level of gene and transport activity in the PLHC-1 fish cell line. *Chemico-Biological Interactions*, v. 198, p. 9-17, 2012.

Epel, D. Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v. 120, p. 23-28, 1998.

Eufemia, N.A.; Epel, D. Induction of the Multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquatic Toxicology*, v. 49, p. 89-100, 2000.

Evans, S.M.; Casartelli, A.; Herreros, E.; Minnick, D.T.; Day, C.; George, E.; Westmoreland, C. Development of a high throughput *in vitro* toxicity screen predictive of high acute *in vivo* toxic potential. *Toxicology In Vitro*, v. 15, p. 579-584, 2001.

Faria, M.; Navarro, A.; Luckenbach, T.; Piña, B.; Barata, C. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquatic Toxicology*, v. 101, p. 78-87, 2011.

Fernández-Sanjuan, M.; Faria, M.; Lacorte, S.; Barata, C. Bioaccumulation and effects of perfluorinated compounds (PFCs) in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 20, p. 2661-2669, 2013.

Ferreira, M.; Santos, P.; Rey-Salgueiro, L.; Zaja, R.; Reis-Henriques, M.A.; Smital, T. The first demonstration of CYP1A and the ABC protein (s) gene expression and activity in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) primary hepatocytes. *Chemosphere*, v. 100, p. 152-159, 2014.

Franzellitti, S.; Capuzzo, A.; Viarengo, A.; Fabbri, E. Interactive effects of nickel and chlorpyrifos on Mediterranean mussel cAMP-mediated cell signaling and MXR-related gene expressions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 154, p. 377-383, 2011.

Franzellitti, S.; Striano, T.; Pretolani, F.; Fabbri, E. Investigating appearance and regulation of the MXR phenotype in early embryo stages of the Mediterranean

mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 199, p. 1-10, 2017.

Garle, M.J.; Fentem, J.H.; Fry, J.R. *In vitro* cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity *in vivo*. *Toxicology In Vitro*, v. 8, p. 1303-1312, 1994.

Georgantzopoulou, A.; Cambier, S.; Serchi, T.; Kruszewski, M.; Balachandran, Y.L.; Grysan, P.; Audinot, J.N.; Ziebel, J.; Guignard, C.; Gutleb, A.C.; Murk, A.J. Inhibition of multixenobiotic resistance transporters (MXR) by silver nanoparticles and ions *in vitro* and in *Daphnia magna*. *Science of the Total Environment*, v. 569, p. 681-689, 2016.

Grosell, M. Copper, in *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. *Fish Physiology*, v. 31(A), p. 53-133, 2012.

Grosell, M.; Blanchard, J.; Brix, K.V.; Gerdes, R. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquatic Toxicology*, v. 84, p. 162-172, 2007.

Grosell, M.; Nielsen, C.; Bianchini, A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 133, p. 287-303, 2002.

Grosell, M.; Wood, C.M. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *Journal of Experimental Biology*, v. 205, p. 1179-1188, 2002.

Hasanabady, M.H.; Kalalinia, F. ABCG2 inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer. *Journal of Biosciences*, v. 41, p. 313-324, 2016.

Helmuth, B.; Mieszkowska, N.; Moore, P.; Hawkins, S.J. Living on the edge of two changing worlds: forecasting the responses of rocky intertidal ecosystems to climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 37, p. 373-404, 2006.

Hollenstein, K.; Frei, D.C.; Locher, K.P. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*, v. 446, p. 213-216, 2007.

Honorato, T.B.M.; Boni, R.; Silva, P.M.; Marques-Santos, L.F. Effects of salinity on the immune system cells of the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 486, p. 22-31, 2017.

Hu, J.; Zhang, X.; Wang, F.; Yang, K.; Xu, M.; To, K.K.; Li, Q.; Fu, L. Effect of ceritinib (LDK378) on enhancement of chemotherapeutic agents in ABCB1 and ABCG2 overexpressing cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget*, v. 42, p. 44643-44659, 2015.

Huang, L.; Wang, J.; Chen, W.C.; Li, H.Y.; Liu, J.S.; Jiang, T.; Yang, W.D. P-glycoprotein expression in *Perna viridis* after exposure to *Prorocentrum lima*, a dinoflagellate producing DSP toxins. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 39, p. 254-262, 2014.

Jeong, C.; Kim, B.; Kim, R.; Park, H.; Lee, S.; Shin, K.; Leung, K.; Rhee, J.; Lee, J. Functional characterization of P-glycoprotein in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* and its potential role in remediating metal pollution. *Aquatic Toxicology*, v. 156, p. 135-147, 2014.

Jeong, C.; Kim, H.K.; Kang, H. Lee, J. ATP-binding cassette (ABC) proteins in aquatic invertebrates: Evolutionary significance and application in marine ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, v. 185, p. 29-39, 2017.

Jones, L.H.; Jones, N.V.; Radlett, A.J. Some effects of salinity on the toxicity of copper to the polychaete *Nereis diversicolor*. *Estuarine and Coastal Marine Science*, v. 4, p. 107-111, 1976.

Juliano, R.L.; Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug in Chinese hamster ovary cell mutants permeability. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 455, p. 152-162, 1976.

Keppler, C.J.; Ringwood, A.H. Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*, v. 52, p. 81-96, 2001.

Kingtong, S.; Chitramvong, Y.; Janvilisri, T. ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of environmental organic pollutant tributyltin. *Aquatic Toxicology*, v. 85, p. 124-132, 2007.

Kropf, C.; Segner, H.; Fent, K. ABC transporters and xenobiotic defense systems in early life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 185-186, p. 45-56, 2016.

Kurelec, B. Reversion of the multixenobiotic resistance mechanism in gills of a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* by a model inhibitor and environmental modulators of P170-glycoprotein. *Aquatic Toxicology*, v. 33, p. 93-103, 1995.

Kurelec, B.; Lucić, D.; Pivčević, B.; Krc̄a, S. Induction and reversion of Multixenobiotic resistance in the marine snail *Monodonta turbinata*. *Marine Biology*, v. 123, p. 305-312, 1995.a

Kurelec, B.; Pivčević, B.; Müller, W.E.G. Determination of pollutants with multixenobiotic resistance inhibiting properties. *Marine Environmental Research*, v. 39, p. 261-265, 1995b.

Kurelec, B.; Smital, T.; Pivčević, B.; Eufemia, N.; Epel, D. Multixenobiotic resistance, P-Glycoprotein and chemosensitizers. *Ecotoxicology*, v. 9, p. 307-327, 2000.

La Fontaine, S.; Mercer, J.F.B. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 463, p. 149-167, 2007.

Lee, J.A.; Marsden, I.D.; Glover, C.N. The influence of salinity on copper accumulation and its toxic effects in estuarine animals with differing osmoregulatory strategies. *Aquatic Toxicology*, v. 99, p. 65-72, 2010.

Luedeking, A.; Koehler, A.; Regulation of expression of Multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, v. 69, p. 1-10, 2004.

Lutsenko, S.; LeShane, E.S.; Shinde, U. Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 463, p. 134-148, 2007.

Marangoni, L.F.B.; Marques, J.A.; Duarte, G.A.S.; Pereira, C.M.; Calderon, E.N.; Castro, C.B.; Bianchini, A. Copper effects on biomarkers associated with photosynthesis, oxidative status and calcification in the Brazilian coral *Mussismilia hartii* (Scleractinia, Mussidae). *Marine Environmental Research*, in press, 2017.

Marin, M.; Poret, A.; Maillet, G.; Le Boulenger, F.; Le Foll, F. Regulation of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels in multi-drug resistant MCF7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 334, p. 1266-1278, 2005.

Melo K.V., Amaral F.D. Ampliação da distribuição das anêmonas-do-mar (Cnidaria, Actiniaria) no estado de Pernambuco, Brasil. *Tropical Oceanography*, v. 33, p. 9-31, 2005.

Minier, C.; Borghi, V.; Moore, M.N.; Porte, C. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, v. 50, p. 167-176, 2000.

Monteiro, S.C.R.; Pinho, G.L.L. Hoffman, K. Barcarolli, I.F.; Bianchini, A. Acute waterborne copper toxicity to the euryhaline copepod at different salinities: influence of natural freshwater and marine dissolved organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 32, p. 1412-1419, 2013.

Moore, M.N.; Depledge, M.H.; Readman, J.W.; Leonard, D.R.P. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research*, v. 552, p. 247-268, 2004.

Nornberg, B.F.; Batista, C.R.; Almeida, D.V.; Trindade, G.S.; Marins, L.F. ABCB1 and ABCC4 efflux transporters are involved in methyl parathion detoxification in ZFL cells. *Toxicology in Vitro*, v. 29, p. 204-210, 2015.

Oliveira, J.S.; Fuentes-Silva, D.; King, G.F. Development of a rational nomenclature for naming peptide and protein toxins from sea anemones. *Toxicon*, v. 60, p. 539-550, 2012.

Oliveira, L.F.; Silva, S.M.C.P.; Martinez, C.B.R.; Assessment of domestic landfill leachate toxicity to the Asian clam *Corbicula fluminea* via biomarkers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 103, p. 17-23, 2014.

Parsell, D.A., Lindquist, S. Heat shock proteins and stress tolerance. In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, pp. 457–494, 1994.

Patel, A.; Li, T.; Anreddy, N.; Wang, D.; Sodani, K.; Gadhia, S.; Kathawala, R.; Yang, D.; Cheng, C.; Chen, Z. Suppression of ABCG2 mediated MDR *in vitro* and *in vivo* by a novel inhibitor of ABCG2 drug transport. *Pharmacological Research*, v. 121; p. 184-193, 2017.

Rao, D.G.P.; Khan, M.A. Zebra mussels: enhancement of copper toxicity by high temperature and its relationship with respiration and metabolism. *Water Environment Research*, v. 72, p. 175–178, 2010.

Rioult, D.; Pasquier, J.; Boulangé-Lecomte, C.; Poret, A.; Abbas, I.; Marin, M.; Minier, C.; Le Foll, F. The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. *Aquatic Toxicology*, v. 153, p. 98-109, 2014.

Robey, R.W.; Shukla, S.; Finley, E.M.; Oldham, R.K.; Barnett, D.; Ambudkar, S.V.; Fojo, T.; Bates, S.E. Inhibition of P-glycoprotein (ABCB1) and multidrug resistance associated protein 1 (ABCC1) mediated transport by the orally administered inhibitor, CBT-1®. *Biochemical Pharmacology*, v. 75, p. 1302-1312, 2008.

Robinson, J.F.; Theunissen, P.T.; Dartel, D.A.M.; Penning, J.L.; Faustman, E.M.; Piersma, A.H. Comparison of MeHg-induced toxicogenomic responses across *in vivo* and *in vitro* models used in developmental toxicology. *Reproductive Toxicology*, v. 32, p. 180-188, 2011.

Rocha, C.T.; Souza, M.M. The influence of lead on different proteins in gill cells from the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*, from defense to repair biomarkers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 62, p. 56-67, 2012.

Sandrine, P.; Marc, P. Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. *Chemosphere*, v. 67, p. 1258-1263, 2007.

Sauerborn, K.R.; Zaja, R.; Frankević, D.; Brozović, A.; Smital, T. Presence of ecotoxicologically relevant Pgp and MRP transcripts and proteins in Cyprinid fish. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, v. 61, p. 175-182, 2010.

Schneider, E.; Hunke, S. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 22, p. 1-20, 1998.

Shugart, L.R.; McCarthy, J.F.; Halbrook, R.S. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Analysis*, v. 12, p. 353-360, 1992.

Silva, E.S.; Abril, S.I.M.; Zanette, J.; Bianchini, A. Salinity-dependent copper accumulation in the guppy *Poecilia vivipara* is associated with CTR1 and ATP7B transcriptional regulation. *Aquatic Toxicology*, v. 152, p. 300-307, 2014.

Smital, T.; Sauerborn, R.; Pivčević, B.; Krc̃a, S.; Kurelec, B. Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of Multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 126, p. 175-186, 2000.

Sokolova, I.M.; Lannig, G. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research*, v. 37, p. 181-201, 2008.

Soroldoni, S.; Abreu, F.; Castro, I.B.; Duarte, F.A.; Pinho, G.L.L. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? *Journal of Hazardous Materials*, v. 330, p. 76-82, 2017.

Stas, J.; Kopljar, I.; Labro, A.; Peigneur, S.; Zaharenko, A.J.; Tygat, J.; Snyders, D.J. A gating modulator peptide toxin for *Shaker*-Type Kv1 channels derived from the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Biophysical Journal*, v. 104, p. 125a, 2013.

Tamás, M.J.; Sharma, S.K.; Ibstedt, S.; Jacobson, T.; Christen, P. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules*, v. 4, p. 252-267, 2014.

Timofeyev, M.A.; Shatilina, Z.M.; Bedulina, D.S.; Menzel, R.; Steinberg, C.E.W. Natural organic matter (NOM) has the potential to modify the multixenobiotic resistance (MXR) activity in freshwater amphipods *Eulimnogammarus cyaneus* and



*E. verrucosus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, v. 146, p. 496-503, 2007.

Tiwari, A.K.; Sodani, K.; Wang, S.R.; Kuang, Y.H.; Ashby, C.R.Jr.; Chen, X.; Chen, Z.S. Nilotinib (AMN107, Tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. Biochemical Pharmacology, v. 78, p. 153-161, 2009.

Treptow, W.L.; Sousa, M.V.; Carvalho, K.M.C.; Maigret, B. The structure of a new sea anemone toxin: a molecular modeling study of cangitoxin. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, v. 624, p. 87-95, 2003.

Vehniäinen, E.; Kukkonen, J.V.K. Multixenobiotic resistance efflux activity in *Daphnia magna* and *Lumbriculus variegatus*. Chemosphere, v. 124, p. 143-149, 2015.

Walker, C.H., Hopkin, S.P.; Sibly, R.M.; Peakall, D.B. *Principles of Ecotoxicology*, 2<sup>a</sup> edição, Londres: Taylor and Francis, 2001. 326 p.

Wallner-Kersanacha, M.; Mirlean, N.; Baumgarten, M.G.Z.; Costa, L.D.F.; Baisch, P. Temporal evolution of the contamination in the southern area of the Patos Lagoon estuary, RS, Brazil. Journal of Integrated Coastal Zone Management, v. 16, p. 1-18, 2016.

Wiesinger, M.; Mayer, B.; Jennings, P.; Lukas, A. Comparative analysis of perturbed molecular pathways identified in *in vitro* and *in vivo* toxicology studies. Toxicology *in Vitro*, v. 26, p. 956-962, 2012.

Wong, S.M.; Chase Jr., H.S. Role of intracellular calcium in cellular volume regulation. American Journal of Physiology – Cell Physiology, v. 250, p. 841-852, 1986.

Zaharenko, A.J.; Ferreira Jr., W.A.; Oliveira, J.S.; Konno, K.; Richardson, M.; Schiavon, E.; Wanke, E.; Freitas, J.C. Revisiting cangitoxin, a sea anemone peptide: purification and characterization of cangitoxins II and III from the venom of *Bunodosoma cangicum*. Toxicon, v. 51, p. 1303-1307, 2008a.

Zaharenko, A.J.; Ferreira Jr.; Oliveira, J.S.; Richardson, M.; Pimenta, D.C.; Konno, K.; Portaro, F.C.V. Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: novel peptides belonging to new classes of toxins. Comparative Biochemistry and Physiology part D, v. 3, p. 219-225, 2008b.

Zhang, G.N.; Ashby, C.R.Jr.; Zhang, Y.K.; Chen, Z.S.; Guo, H. The reversal of antineoplastic drug resistance in cancer cells by  $\beta$ -elemene. Chinese Journal of Cancer, v. 34, p. 488-495, 2015.

Zucchi, S.; Corsi, I.; Luckenbach, T.; Bard, S.H.; Regoli, F.; Focardi, S. Identification of five partial ABC genes in the liver of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* and sensitivity of ABCB1 and ABCC2 to Cd exposure. *Environmental Pollution*, v. 158, p. 2746-2756, 2010.