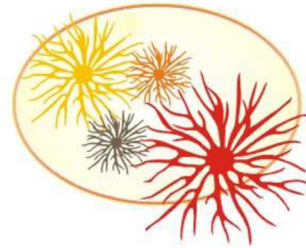




Universidade Federal do Rio Grande

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas



O cálcio participa da modulação da atividade de efluxo das proteínas ABC?

Emmanuele do Couto Lima

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
no Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas, da Universidade Federal do Rio
Grande – FURG

Orientadora: Prof^a Dra. Marta Marques de Souza

Coorientadora: Dra. Fernanda Moreira Lopes

Rio Grande- RS

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos familiares e amigos próximos pelo apoio e incentivo em todos os momentos. Agradeço aos colegas do “grupo”, pelos aprendizados e momentos bons compartilhados em meio ao caos. Um obrigada especial a Nicole Guidony e Fernanda Lopes pelos ensinamentos práticos e teóricos. Agradeço muitíssimo a orientação que recebi da Prf^a Dr^a Marta Souza, você ensina com maestria. Agradeço aos técnicos de laboratório do ICB pelo ótimo suporte e também aos professores que contribuíram com a minha formação, obrigada. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Rio Grande pela experiência e a CAPES pelo auxílio financeiro durante todo o período de realização do presente trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

Resumo geral e palavras-chave.....	5
<i>Abstract and keywords</i>	6
Introdução geral.....	7
Superfamília de proteínas ABC ATP <i>Binding cassette</i> : estrutura, função e sinalização.....	7
Íon cálcio.....	11
Fosforilação via proteínas cinases.....	13
Modelo experimental.....	15
Objetivos.....	15
Manuscrito.....	17
Introduction.....	18
Material and Methods.....	20
Results.....	23
Discussion.....	25
References.....	29
Discussão Geral.....	34
Bibliografia Geral.....	36

RESUMO GERAL

As proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) são ATPases inespecíficas localizadas na membrana celular de diferentes tecidos animais, sendo reconhecidas primordialmente por realizar o efluxo de xenobióticos e produtos do metabolismo celular modulando assim concentração de toxinas intracelulares nos organismos. Ao acoplar a energia da hidrólise do ATP, as ABC transportam uma grande variedade de substâncias citotóxicas do citosol para o meio extracelular. No que corresponde a sua caracterização, dados concisos acerca da expressão gênica e proteica, localização e função elucidam parte do conhecimento sobre a biologia destes transportadores, entretanto, a via de sinalização que regula a ativação permanece em debate. Este trabalho teve por objetivo avaliar se as oscilações do íon cálcio (Ca^{2+}) e o aumento de atividade das proteínas cinases dependentes de cálcio (cPKC) participam da ativação dos transportadores ABC na linhagem ZF-L (hepatócitos de *zebrafish*). As células foram expostas a condições de baixa disponibilidade de Ca^{2+} intracelular (Dantrolene 10mM e Bapta-AM 5 μM), zero cálcio no meio extracelular (meio livre de Ca^{2+} com EGTA), alta disponibilidade intracelular de Ca^{2+} (Cafeína 20mM) e incremento da ativação das cPKC (PMA 200mM) avaliando-se a atividade de efluxo das ABC em cada condição experimental. O efluxo das ABCs foi mensurado através do ensaio com Rodamina B 5 μM . As condições experimentais que apresentaram as maiores taxas de efluxo foram observadas durante a alta disponibilidade de cálcio e ativação de cPKC, sugerindo que o aumento da disponibilidade intracelular de Ca^{2+} está relacionada com o aumento na atividade de efluxo dos transportadores ABC, apontando a fosforilação via cPKC como possível constituinte da via de sinalização de ativação das ABC na linhagem ZF-L.

PALAVRAS-CHAVE: ATPases, defesa celular, hepatocito, MXR, sinalização celular, ZF-L

ABSTRACT

ABC (ATP-Binding Cassette) proteins are nonspecific acting in the cell membrane of different animal tissues, being recognized primarily by performing the efflux of xenobiotics and products of the cellular metabolism thus modulating concentration of intracellular toxins in the organisms. By coupling the energy from ATP hydrolysis, ABCs carry a wide variety of cytotoxic substances from cytosol to the extracellular medium. As regards its characterization, concise data on gene and protein expression, location and function elucidate part of the knowledge about the biology of these carriers, however, the signaling route that regulates the activation remains in dispute. The objective of this work was to assess whether calcium oscillations (Ca^{2+}) and the increase of activity of calcium-dependent kinases (cPKC) proteins participate in the activation of ABC conveyors in ZF-L lineage (zebrafish hepatocytes). Cells were exposed to conditions of low availability of intracellular Ca^{2+} (Dantrolene 10 μ M and Bapta-AM 5 μ M), zero calcium in the extracellular medium (free Ca^{2+} medium with EGTA), high intracellular availability of Ca^{2+} (Caffeine 20 μ M) and increased activation cPKC (PMA 200 μ M) evaluating the efflux activity of ABCs in each experimental condition. ABCS efflux was measured by testing with Rhodamine B 5 μ M. The experimental conditions that presented the highest efflux rates were observed during the high availability of calcium and cPKC activation, suggesting that increased intracellular availability of Ca^{2+} sterily with the increase in the efflux activity of ABC conveyors, pointing to phosphorylation via cPKC as Possible constituent of the ABC activation signaling pathway in the ZF-L lineage.

Keywords: ATPASES, cellular defense, hepatocyte, MXR, cell signage, ZF-L

INTRODUÇÃO GERAL

SUPERFAMÍLIA DE PROTEÍNAS ABC *ATP BINDING CASSETTE*: ESTRUTURA, FUNÇÃO E SINALIZAÇÃO

Existir como ser vivo no planeta terra é um encargo que exige dos organismos uma infinidade de funções fisiológicas complexas, ordenadas e distintas. A manutenção da vida que ocorre entre o nascimento e a morte de um organismo é marcada por uma série de etapas que contemplam, em linhas gerais, a proteção e a perpetuação das espécies. A nível celular, a evolução da vida na terra exigiu que todas as células desenvolvessem mecanismos para, incessantemente, sentir e responder às mudanças em seu ambiente químico interno e externo como requisito crucial para a sobrevivência em condições desfavoráveis (Efferth and Volm, 2017).

A refinada maquinaria celular dispõe de elementos para que as células eucarióticas executem as funções necessárias à sua sobrevivência. A bicamada lipídica que compõe a membrana plasmática, além de fornecer delimitação espacial, local de ancoragem de proteínas celulares, é uma barreira para absorção, distribuição e eliminação de compostos indesejáveis ao ambiente celular. Quando as células são expostas a substâncias citotóxicas, sejam elas endógenas ou não, faz-se necessário que mecanismos de defesa celular sejam ativados e estas substâncias removidas do citosol (Higgins e Lington 2004).

Ao atravessar a membrana plasmática, os xenobióticos ou os produtos endógenos do metabolismo celular podem ser direcionados a uma via de desintoxicação, a fim de serem eliminados do ambiente celular por meio da biotransformação ou até mesmo serem eliminados sem sofrer alterações químicas através de proteínas transportadoras (Bard, 2000). Em síntese, a biotransformação consiste em um processo mediado por reações enzimáticas que alteram quimicamente os xenobióticos, tornando-os polar e solúvel em água, possibilitando assim a desintoxicação e eliminação do composto. Todavia, a biotransformação não é o mecanismo único da desintoxicação celular. Outro mecanismo relevante de defesa celular consiste no efluxo de xenobióticos realizado pelos transportadores ABC (Lopes et al., 2018).

Os transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) pertencem a uma superfamília de proteínas de membrana identificados em diferentes organismos, que vão de bactérias a vertebrados. Ao realizar o efluxo de xenobióticos e produtos do metabolismo celular, as ABCs modulam, desta forma, concentração de toxinas intracelulares nos organismos

(Caminada et al., 2008). Fortes evidências bioquímicas sustentam que essas proteínas acoplam a energia de hidrólise do ATP ao transporte de uma grande variedade de substâncias, atuando como verdadeiras bombas de efluxo ao retirar do citosol uma série de compostos citotóxicos e não correlacionados quimicamente entre si (Riordan and Ling, 1979; Dean and Annilo, 2005).

Tendo seus genes conservados e sendo expressos a nível fisiológico em diferentes tecidos (figura 1) com função de trocas, (barreira hematoencefálica, barreira testicular, intestino, rins, e fígado, por exemplo), as ABCs desempenham um importante papel, *a priori*, protetivo (Borst and Schinkel, 1997). Além disso, um aumento na expressão desses transportadores, observado em células cancerígenas, confere o fenótipo de resistência à múltiplas drogas (MDR) e em tecidos de animais expostos a intensa poluição ambiental, confere o fenótipo de resistência a múltiplos xenobióticos (MXR) (Kurelec, 1992; Jeong et.al., 2017).

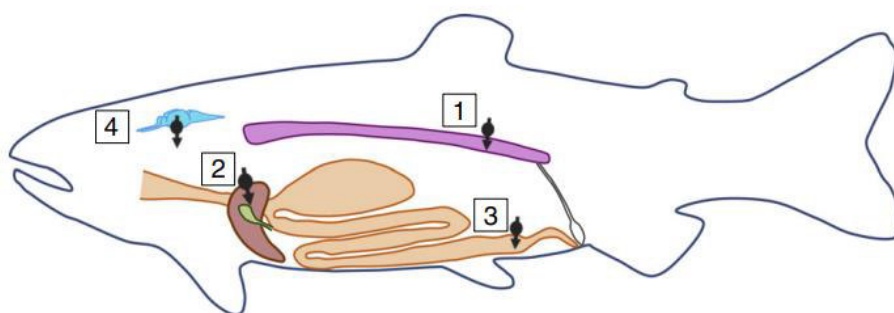


Figura 1: Locais de expressão das ABCs usando peixe teleosteo como exemplo: vias renais (1); hepáticas e biliares (2); intestino (3); capilares endoteliais que constituem a barreira cerebral (4) (Adaptado de Luckenbach et al., 2014).

As proteínas da superfamília ABC estão divididos em 6 subfamílias de acordo com similaridade de seqüência de seus domínios de ligação de nucleotídeos: ABCA-ABCD, ABCG e ABCH (Luckenbach et al., 2014). Estruturalmente, essas proteínas apresentam um “Núcleo ABC” que contém dois domínios de abrangência de membrana TMDs (*transmembrane domain*) e dois domínios citoplasmáticos NBDs (*nucleotide binding domain*) que são conectados por alças intracelulares, como ilustrado na figura 2. Os

transportadores podem existir também como heterodímeros de transportadores "curtos" ou transportadores ABC "longos", que contêm um extensão N-terminal adicional (Wilkins, 2015).

Os domínios hidrofóbicos TMD consistem em alfa-hélices que atravessam e ancoram a proteína na membrana celular formando um “local de passagem”, o qual o substrato se liga e é transportado. Já os domínios hidrofílicos de ligação a nucleotídeos (NBD), possuem suas estruturas voltadas para a parte citoplasmática, formando um compartimento molecular onde ocorre a hidrólise do ATP (adenosina trifosfato) (Miller, 2010).

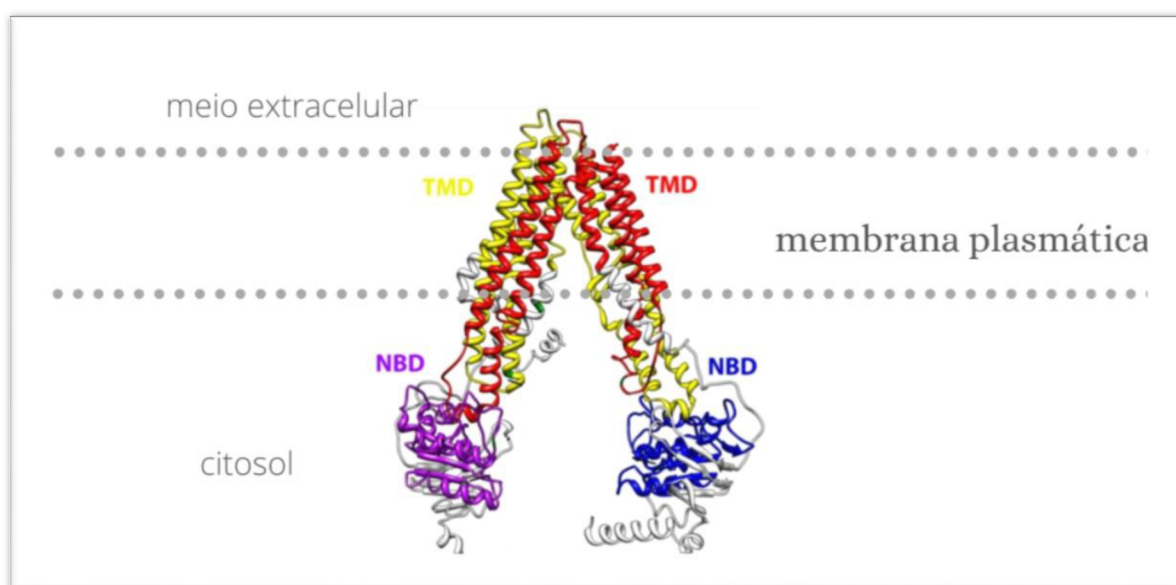


Figura 2: Estrutura espacial dos transportadores ABC (ABCB1) na membrana plasmática evidenciando os domínios NBD, que realizam a hidrólise do ATP e os domínios TMD, ancorados na região transmembrana onde ocorre a formação do “local de passagem” e o transporte do substrato. (Adaptado de Paolini et al., 2015)

Os substratos que as ABCs transportam são inespecíficos e variados, compartilhando entre si apenas algumas similaridades físicas como: hidrofobicidade moderada, baixo peso molecular e domínios carregados positivamente (catiônicos) ou neutros (Luckenbach et al., 2014). Por outro lado, substâncias químicas como alguns fármacos tem potencial para inibir a atividade de efluxo das ABC, num processo conhecido como quimiossensibilização (figura 3). A quimiossensibilização pode ser uma

ferramenta em estudos *in vitro* e pode também ocorrer “naturalmente”, quando os animais são expostos à poluição ambiental, uma vez que muitos poluentes são, ao mesmo tempo, agentes quimiossensibilizantes das ABCs.

Do ponto de vista ecotoxicológico, a quimiossensibilização pode ocorrer por meio de agentes tóxicos ambientais de origem natural ou antropogênica nos organismos. A modulação da atividade das ABCs nestes animais tende a ser nociva pois, ao inibir o efluxo, as células ficam expostas a substâncias que seriam normalmente excluídas do ambiente celular e, para sobreviver em ambientes poluídos, os organismos requerem ABCs funcionais (Epel et al., 2008). Apesar da classificação das substâncias químicas em substrato ou inibidor da atividade de efluxo, essas duas categorias não são excludentes, uma vez que alguns compostos classificados como inibidores são, na verdade, substratos das ABCs e a inibição da atividade ocorre por competição entre os substratos (Sharom, 1997).

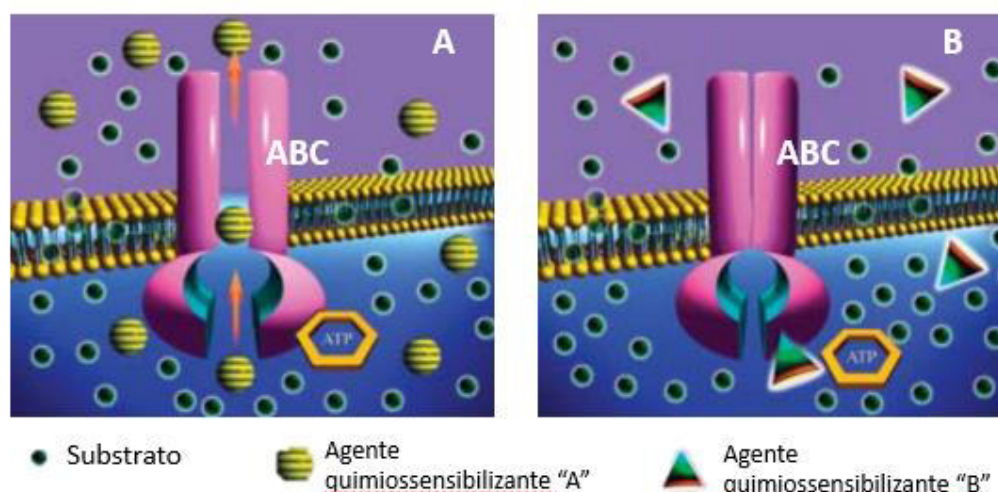


Figura 3: Representação esquemática do processo de quimiossensibilização dos transportadores ABC. À esquerda está representado o bloqueio do efluxo do transportador ABC por inibição competitiva do quimiossensibilizante “A” com o substrato. À direita está representado a inibição do transportador ABC por interação direta com quimiossensibilizante “B”, impedindo a atividade de transporte. A consequência de ambas situações é o acúmulo do substrato (xenobiótico) no citosol (Adaptado de Thomas e Coley, 2003)

Inicialmente identificados em células tumorais resistentes a quimioterapia farmacológica na década de 70, os transportadores ABC são extensivamente estudados, sobretudo quanto a sua expressão gênica e funcionamento em diferentes organismos e

modelos celulares (Ambudkar et al., 1999; Mealey e Fidel, 2015; Jaramillo et al., 2018). Ainda que atualmente saiba-se muito sobre a função das ABCs, a regulação da função transportadora destas proteínas no nível pós-traducional permanece em disputa, gerando uma lacuna crítica na nossa compreensão acerca da biologia destes transportadores.

No campo das ciências médicas, os estudos concentram-se em contornar o fenótipo MDR através da modulação da atividade das ABCs em estudos *in vitro*. A abordagem mais comum nestes estudos consiste em co-administrar fármacos bloqueadores da atividade de efluxo das ABCs associados a drogas anticâncer, objetivando aumentar a concentração intracelular dos quimioterápicos em células MDR (Fletcher et al., 2016). Alguns estudos em células com esta abordagem utilizam fármacos da classe dos bloqueadores dos canais de cálcio, enquanto inibidores das ABCs (verapamil, diltiazem, galopamil, flunarizina, nimodipidino e nifedipidina), sendo o verapamil fármaco mais extensamente aplicado (Barancík et al., 1994; Muzi et al., 2009).

Fármacos bloqueadores dos canais de cálcio, em sua maioria, interagem diretamente com os transportadores na forma de substrato e inibem as ABCs por meio da inibição competitiva (Thomas e Coley, 2003; Gupta et al., 2020). Entretanto, apesar do bloqueio da atividade de efluxo das ABCs ocorrer por mecanismos distintos do seu propósito terapêutico, é presumível que ocorra, paralelamente, alterações na homeostase do cálcio intracelular. Com base nisto, uma questão pode ser levantada: existe relação entre as oscilações transitórias do íon cálcio e a via de sinalização de ativação das ABCs?

ÍON CÁLCIO

Bivalente, o íon cálcio ionizado está presente na composição elementar dos sistemas biológicos, (em torno de 2mM na concentração extracelular e 100nM na concentração intracelular) atuando como segundo mensageiro em processos celulares como fecundação, mitose, remodelação de organelas, crescimento, neurotransmissão, contração muscular e morte celular, sendo o íon mais fortemente regulado em todos os organismos (Clapham, 2007).

Por ser capaz de desencadear uma gama de respostas celulares, sua disponibilidade no citosol é regulada por um controle fino dos picos (elevação transitória da concentração citoplasmática) e, ao contrário de moléculas complexas, o cálcio não

pode ser quimicamente modificado. Assim, para que as células exerçam controle sobre este íon e suas interações, estas devem ser capazes de: quelar, compartimentar ou realizar a extrusão de maneira rápida e eficiente (Berridge et al., 2000).

As proteínas carreadoras e canais de cálcio localizadas na membrana plasmática e na membrana das organelas atuam fortemente neste processo regulatório. Em linhas gerais, a indução do influxo de cálcio extracelular para o citosol é um modulador importante da dinâmica do cálcio e é realizado pelos canais de cálcio voltagem dependente (CaV), canais acionados por receptor (ROCC), canais operados por armazenamento (SOCC) e canais operados por ligante, particularmente importantes na sinalização neuronal (Karlstad et al., 2012). A extrusão do cálcio para o espaço extracelular é mediada pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e pela Ca^{2+} ATPase (PMCA) da membrana plasmática (Clapham, 2007).

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela presente em todas as células eucarióticas dotado de canais especializados no transporte de cálcio, divididos em duas famílias: os receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3Rs) e os receptores de rianodina (RyRs). Tanto os InsP3Rs quanto os RyRs formam grandes estruturas oligoméricas por associação de suas quatro subunidades. As estruturas dos InsP3Rs e RyRs apresentam grande homologia de sequência geral, particularmente nas regiões de origem dos poros dos canais, entretanto, o significado das formas heteroméricas não é bem compreendido (Ge and Mp, 2011).

Além da sua função de síntese, modificação e armazenamento de proteínas, o RE possui uma alta capacidade de estocar cálcio intracelular em altas concentrações, que o torna de extrema importância enquanto mediador de processos celulares que envolvem cálcio (figura 5), como as vias de sinalização que coordenam as funções de proteínas intracelulares (Marchi et al., 2018). Assim como o RE, outras organelas como mitocôndria e aparelho de Golgi são descritos pela capacidade de estocar cálcio em células, variando a sua atuação/importância de acordo com o tipo celular (Urabe et al., 2020).

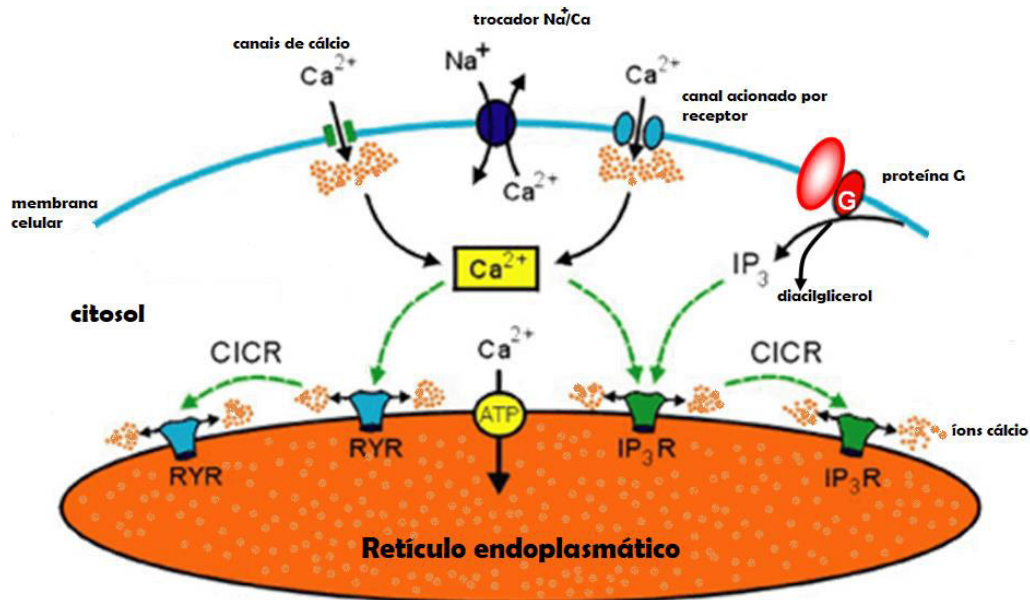


Figura 4: representação dos canais, bombas e receptores envolvidos na regulação do cálcio citoplasmático presentes na membrana plasmática e na membrana do retículo endoplasmático. RYR: receptor de rianodina; IP_3R : receptor de IP_3 , CICR: liberação de cálcio induzida por cálcio. Acessada em 15/10/2021 (<https://www.gratispng.com/baixar/sinaliza%C3%A7%C3%A3o-celular.html>). Adaptado pela autora.

FOSFORILAÇÃO VIA PROTEÍNAS CINASES

Sob outra perspectiva, porém ainda considerando a presença e a dependência do íon cálcio, discute-se o papel das proteínas cinases convencionais – dependentes de cálcio – cPKC na ativação das ABC (Tsuruoka et al., 2001). As proteínas cinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato de ATP ou GTP para resíduos de tirosina (Tyr), treonina (Thr) e serina (Ser) produzindo uma mudança conformacional ou de carga na proteína fosforilada, coordenando assim a sua função biológica (Stolarczyk et al., 2010).

Dentre os mecanismos pós-traducionais de regulação, a fosforilação é um dos mais frequentemente utilizado no ambiente celular e fornece um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas envolvidas em um ampla gama de funções biológicas (Slatter et al., 2005). A disponibilidade de ATP como fonte energética bem como a facilidade de reversibilidade da fosforilação são, provavelmente, as razões pelas quais as células adotaram tão extensivamente este mecanismo regulatório. Logo, a

fosforilação fornece às células uma maneira rápida, eficaz e com baixo custo energético para promover a sua regulação (Silva et al., 2009).

A família PKC de mamíferos, representada esquematicamente na figura 5, compreende 10 isoenzimas agrupadas em três classes: (1) PKCs “convencionais” ou “clássicos” (cPKCs) que são compostos de PKC α , duas variantes de *splicing* de PKC β (PKC β I e PKC β II) e PKC γ ; (2) “novos” PKCs (nPKCs), um grupo que inclui PKC δ , PKC ϵ , PKC η e PKC θ ; e (3) PKCs “atípicas” (aPKCs) ζ e ι/λ (PKC ι) é encontrado apenas em primatas e PKC λ é o seu homólogo de rato). Em teleósteos como o *zebrafish*, estas isoenzimas são identificadas de maneira equivalente em diferentes células incluindo o tecido hepático (Slatter et al., 2005).

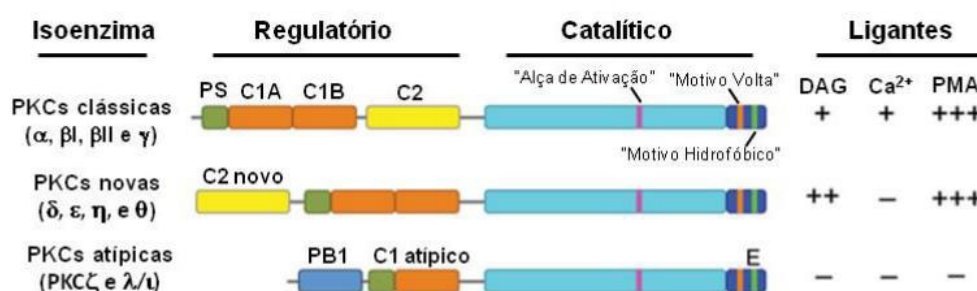


Figura 5: representação esquemática das estruturas de domínios e responsividade a ligante das isoenzimas da PKC. A porção N-terminal contém os seguintes domínios regulatórios: pseudo-substrato autoinibitório “PS” (verde); domínios C1 (laranja) que ligam ao diacilglicerol (DAG) ou ao éster de forbol (PMA); domínio C2 (amarelo) que liga-se ao cálcio; Domínio C1 ou PB1 nas aPKCs (responsável pela interação proteína-proteína). A porção C-terminal contém o domínio catalítico (azul): “alça de ativação”; “motivo volta” e “motivo hidrofóbico (sítios de fosforilação que estabilizam as PKCs); cauda da porção terminal C (E). Os cofatores requeridos para a ativação de cada subfamília, juntamente com suas afinidades relativas são indicados à direita. (Adaptado de Wu-Zhang & Newton, 2013)

Estudos anteriores sustentam que a ativação da PKC pode atuar em diferentes pontos na regulação dos transportadores ABC, como por exemplo, controle da expressão gênica, processo de inserção ou internalização de membrana e estado de fosforilação dos transportadores (Mayati et al., 2017). Entretanto, os estudos que apoiam o papel da fosforilação por PKC dependentes de cálcio no processo regulatório dos transportadores

ABC são, predominantemente realizados em linhagens de células tumorais (Fine et al., 1988; Lelong-Rebel and Cardarelli, 2005). Todavia, alguns pontos relacionados à sinalização são passíveis de extrapolação para outros tipos celulares, como a linhagem ZF-L.

Tendo em vista, portanto, os dados disponíveis na literatura científica até o presente momento e correlacionando os achados, é admissível abordar a modulação da atividade das ABCs sob outro viés. Sem considerar a superexpressão encontrada nos fenótipos MDR e MXR, a abordagem deste trabalho busca investigar se oscilações transitórias do íon cálcio nos meios intracelular e extracelular, bem como o incremento na ativação da PKC dependente de cálcio participam da via de sinalização que modula a atividade de efluxo dos transportadores ABC expressos em hepatócitos de *zebrafish*.

MODELO EXPERIMENTAL: LINHAGEM ZF-L

As linhagens celulares estabelecidas são amplamente utilizadas em estudos *in vitro* nas áreas de fisiologia celular, toxicologia e biomedicina, oferecendo um valioso modelo experimental. Em consonância com os objetivos, a linhagem ZF-L foi escolhida como modelo experimental pois atendia aos requisitos necessários para a realização deste estudo, sendo a expressão fisiológica das ABCs na membrana celular o mais importante.

O fígado é principal órgão responsável pela biotransformação e desintoxicação de vertebrados em geral, incluindo o *zebrafish*. Os hepatócitos são, portanto, células munidas de componentes de defesa celular, como os transportadores ABC e supõe-se, sobretudo, que a linhagem ZF-L possui expressão gênica semelhante a *in vivo* (Eide et al., 2014; Luckenbach et al., 2014).

OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a participação e/ou dependência do íon cálcio e das proteínas cinases dependentes de cálcio na ativação das proteínas ABC expressas a nível fisiológico na membrana celular de hepatócitos de *zebrafish*.

MANUSCRITO

Indicação do periódico de submissão:

Cell Biochemistry and Biophysics

Qualis B2

Does calcium participate in the modulation of the efflux activity of ABC proteins?

Lima, Emmanuele Couto ^{a,b}, Lopes, Fernanda Moreira ^{a,b}, Souza, Marta Marques ^{a,b} *

^a Postgraduate Program in Physiological Sciences, Federal University of Rio Grande, Av Itália Km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

^b Institute of Biological Sciences, Federal University of Rio Grande, Av Itália Km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

Corresponding author *

Dra. Marta M Souza

Institute of Biological Sciences – Federal University of Rio Grande – FURG

e-mail: martasouza@furg.br

Abstract

Membrane transport proteins belonging to the ABC superfamily (ATP-binding cassette) are nonspecific ATPases located in the cell membrane, primarily recognized for extrusion of xenobiotics and modulating the concentration of intracellular toxins in organisms that live in polluted environments. This study aimed to evaluate whether by promoting variations in intracellular and extracellular calcium concentration and also increased activity of calcium-dependent protein kinases (cPKC) would alter the level of efflux activity of ABC transporters in the hepatocyte lineage ZF- L. Thus, the cells were exposed to experimental conditions of low and high availability of calcium and cPKC activation. The efflux rate was measured using the Rhodamine B assay. Experimental conditions that showed a significant increase in efflux rates were observed during high calcium availability and cPKC activation, suggesting that the increased intracellular availability of Ca^{2+} is related to the increased activity level of ABC transporters, indicating phosphorylation via PKC as a possible constituent of the ABC activation signaling pathway.

KEYWORDS: ATPases, cell defense, hepatocyte, MXR, cell signaling, ZF-L

Introduction

ABC transporters (ATP-binding cassette) are nonspecific ATPases located in the plasma membrane of cells in different organisms, primarily recognized for extrusion of xenobiotics and modulating the concentration of intracellular toxins (Caminada et al., 2008). Having their genes conserved and being expressed at a physiological level in tissues with barrier function (Borst and Schinkel, 1997), ABC transporters are also the basis of multixenobiotic resistance (MXR) phenotypes observed in animals exposed to environmental pollution and the multidrug resistance (MDR) phenotype present in tumor cells (Riordan and Ling, 1979; Bard 2000).

As the function of ABC is of interest in different areas due to the pharmacological and environmental context, efforts have been made over the years to better understand the biology of these transporters. Concise data on gene expression, protein conformation and function of these proteins are described in the literature (Germann, 1993; Cornwall et al., 1995; Dean and Annilo, 2005), however, the signaling pathway that modulates the

efflux activity of these proteins it remains, in part, unknown. Strong biochemical evidence supports that these proteins couple ATP hydrolysis energy to the efflux of xenobiotic substances against a concentration gradient (Davidson, 2002; Ferreira et al., 2014), however, the post-translational regulatory mechanism of this activity remains in dispute.

Pharmacological studies aimed at reversing the MDR phenotype seek by blocking the efflux activity of ABC means to circumvent resistance to chemotherapy drugs (Thomas and Coley, 2003). An important strategy in *in vitro* studies is the use of calcium channel blockers, such as verapamil, diltiazem, gallopamil, flunarizine, nimodipidino and nifedipidine. These agents promote the inhibition of efflux activity by directly interacting with the ABCs, mainly in the form of substrates (Barancík et al., 1994; German, 1996).

Although these calcium channel blockers promote the inhibition of ABCs by mechanisms other than their pharmacological purpose, it is admissible to consider that the calcium ion acts at some point in the activation signaling pathway of these transporters, conjecturing that the calcium channel block is simultaneous the inactivation of ABC.

From another investigative perspective, but still considering the presence of calcium, the role of conventional protein kinases – calcium dependent – c PKC in the activation of ABC is discussed (Bates et al., 1993; Tsuruoka et al., 2001). Protein kinases are enzymes that catalyze the phosphorylation of proteins by transferring a phosphate group from ATP or GTP to tyrosine (Tyr), threonine (Thr) and serine (Ser) residues producing a conformational or charge change in the phosphorylated proteins, thus modulating their biological function (Slatter et al., 2005; Stolarczyk et al., 2010).

Most ABC proteins have phosphorylation sites for PKC and it was observed that the increase in efflux activity is related to the phosphorylation status of ABC in different cell lines (Stolarczyk et al., 2010). However, it is still unclear how phosphorylation relates to the transporter function (Fine et al., 1988; Mayati et al., 2017).

Whether from the perspective of reversing the MDR phenotype or from an ecotoxicological point of view, elucidating the mechanisms behind the modulation of the activity of ABC transporters will improve the understanding of cell detoxification, therefore, the present study aims to assess the participation of calcium and of cPKC in the activation of ABC transporters expressed in zebrafish hepatocytes.

Materials and methods

Cell culture

In the present study, established cultures of zebrafish hepatocytes (ZF-L) (Ghosh et.al 1994), obtained from the American Collection – American Type culture collection (ATCC) and deposited at the Cell Bank of Rio de Janeiro – UFRJ, were used. The cells were kept in cell culture flasks at 28°C with the addition of culture medium [40% RPMI 1640 medium, 50% L15 medium, supplemented with sodium bicarbonate (0.2g/L), L-glutamine (0.3g/ L) HEPES (25mM), 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic and antimycotic Penicillin (100U/mL) Streptomycin (100mg/mL) and Amphotericin B (0.25mg/mL)]. Hepatocytes were spiked from 1 to 2 times a week and it was allowed to set up experiments with cells that had been spiked between 5 and 25 times (Witek et al., 2016).

To set up the experiments in a 96-well plate, the cells were previously evaluated for their viability using the trypan blue exclusion method (0.08%). The bottles (cell population) were considered viable when they contained 95% of healthy cells. Hepatocytes were seeded in a 96-well plate at a concentration of 2×10^5 cells/ml and the time of cell adhesion and complete confluence was up to 48h. From 4 to 19 independent experiments were carried out, with 5 replicates each.

ABC activity

The activity of ABC proteins was evaluated through the efflux assay with Rhodamine B (ABC substrate) (Kurelec et al., 2000). In a 96-well plate, the cells were incubated with the fluorescent Rhodamine B $5 \mu\text{M}$ diluted in PBS (phosphate buffered saline – NaCl, KCl, HK_2PO_4 , Na_2HPO_4 ; Sigma, Aldrich) enriched with calcium and magnesium, for 1h at 28°C. After the incubation time, the cells were washed twice with PBS and the efflux solution (Ca^{2+} - free PBS) was added with the different treatments for 1h.

After an efflux time of 1h for all conditions, the supernatant was transferred to an opaque 96-well plate and taken for analysis in a spectrofluorimeter (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) with 485 nm excitation and 590 nm emission, being the fluorescence intensity measured in arbitrary units and expressed in percentage values.

Experimental conditions

To analyze the participation of calcium and PKC in the ABC activation mechanism, the cells were subjected to experimental conditions of supposed modifications in the cytosolic and extracellular calcium concentration, using chemical agents acting on different cellular targets.

Assessment for calcium dependence

The experimental conditions sought to promote changes in calcium concentration in order to increase or decrease the availability of this ion during the efflux of Rhodamine B by ABCs.

Experimental condition Calcium Zero: this experimental condition aimed to reduce the availability of calcium in the extracellular environment. After incubation with 5 μ M Rhodamine B, the cells were washed twice with PBS and then the treatment groups were exposed to the efflux solution composed of PBS and 1mM EGTA (Ethylene glycol-bis (2-aminoethyl ether) -N, N, N', N'-tetraacetic acid) for 1h.

Experimental condition 10mM Dantrolene: in this experimental condition, an attempt was made to decrease the intracellular calcium concentration by blocking the ryanodine channels present in the endoplasmic reticulum (Charles et al., 1993). After incubation with 5 μ M Rhodamine B, the cells were washed twice with PBS and then the efflux solution composed of PBS and 10mM Dantrolene was added for 1h.

Experimental condition Bapta-AM 5 μ M: in this experimental condition, an attempt was made to decrease the intracellular calcium concentration through the use of a calcium chelator Bapta-AM 5 μ M (Collatz et al., 1997). After incubation with 5 μ M Rhodamine B, the cells were washed twice with PBS and then the treatment groups were exposed to the efflux solution composed of PBS and 5 μ M Bapta-AM for 1h.

Experimental condition Caffeine 20mM: to promote increased intracellular availability of calcium, 20mM Caffeine was used. Caffeine is a chemical agent capable of binding to endoplasmic reticulum ryanodine receptors and effecting massive release of calcium into the cytosol (Osada et al., 1994). After incubation with 5 μ M Rhodamine B, cells were washed twice with PBS and then treatment groups were exposed to the efflux solution composed of PBS and 20mM Caffeine for 1h.

Evaluation regarding PKC activation

Experimental condition PMA 200mM: PMA is an agent that binds PKC (calcium-dependent) and promotes their activation independent of the calcium ion (Blobe et al., 1993; Tsuruoka et al., 2001). To promote PKC activation, the groups were exposed to 200mM of PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) for 1h during the incubation phase with Rhodamine B 5 μ M and for another 1h during the efflux phase, in a solution composed of PBS and PMA 200mM.

In the experimental conditions where the chemical agents were soluble in water (Zero Calcium, Caffeine 20mM and PMA 200mM), the efflux solution of the negative control groups was composed of PBS enriched with calcium and magnesium. The controls of conditions whose chemical agents used 0.01% DMSO as solvent (Bapta-AM and Dantrolene) used, in addition to the negative control, a control with the vehicle composed of PBS, 1 mM EGTA and 0.001% DMSO. The fluorescence values obtained in the negative controls and in the DMSO control showed no statistical difference (Guidony et.al. 2021), that is, DMSO does not interfere with the efflux activity of the ABCs.

* All chemicals were purchased from Sigma, Aldrich, St. Louis, MO, USA.

Statistical analysis

For all results, the mean and standard error of the mean for making the graphs ($X \pm SE$) were calculated. The results were submitted to ANOVA (one-way analysis of variance) or the t test, being used as significant values $p \leq 0.05$.

Results

Calcium dependency

Cells exposed to 20 mM Caffeine showed a significant 68% increase in ABC efflux ($P=0.001$; $n=9$) compared to control (100%), represented in Figure 1.

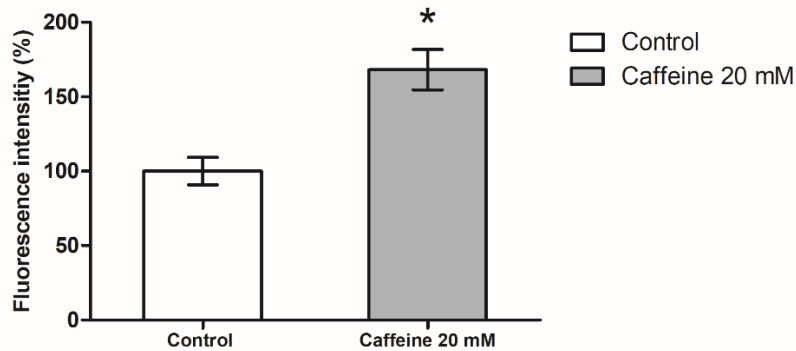
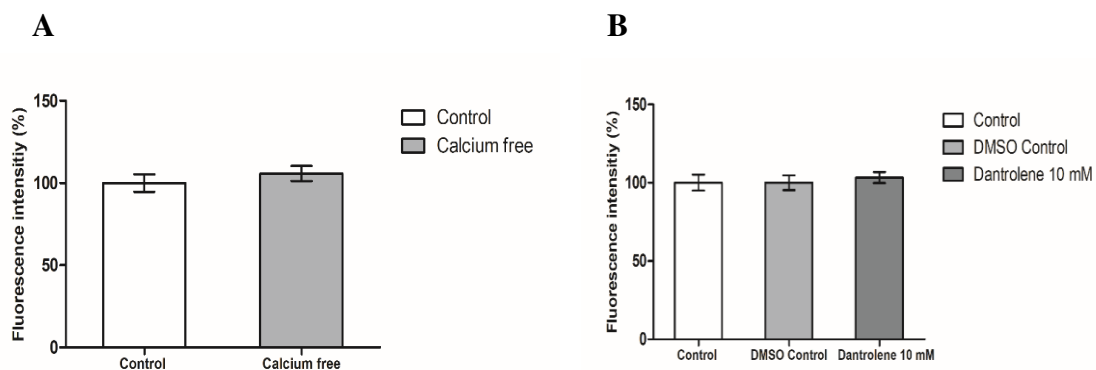


Figure 1: Rhodamine B efflux (% fluorescence) as indicative of ABC protein activity in zebrafish hepatocytes. The bars represent the means (\pm SE) of the fluorescence intensity of Rhodamine B released (at the end of 1h) by cells exposed to Caffeine (20mM), values are expressed as a percentage (%) in relation to the control (100%). * indicates significant difference ($p \leq 0.05$) between groups

Figure 2 shows the efflux of ABC in cells exposed to conditions of low availability of extracellular (Zero calcium) and intracellular (Bapta-AM and Dantrolene) calcium. We observed that under the conditions Zero calcium ($P=0.129$; $n=19$) (fig 2A), Dantrolene ($P=0.831$; $n=13$) (fig 2B) and Bapta-AM ($P=0.861$; $n=7$) (fig 2C) there was no significant difference in relation to the efflux of Rhodamine B from control cells (100%)



C

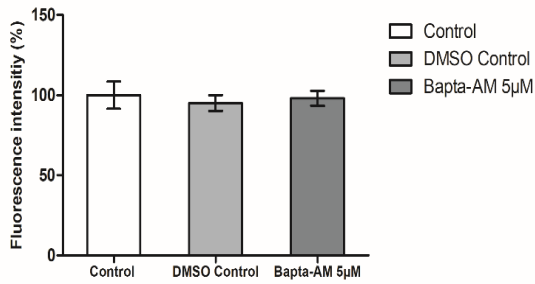


Figure 2: Rhodamine B efflux (% fluorescence) as indicative of ABC protein activity in zebrafish hepatocytes. The bars represent the means (\pm SE) of the fluorescence intensity of Rhodamine B released (at the end of 1h) by the cells exposed to the experimental conditions, the values are expressed as a percentage (%) in relation to the control (100%). Figure A shows the result of cell efflux in the Zero Calcium condition; Figure B shows the result of cells in the Dantrolene condition; Figure C shows the result of the Batta-AM condition. Figures B and C also show the control with the solvent (DMSO 0.01%) used with Dantrolene and Batta-AM

PKC Activation

In cells exposed to 200mM PMA, there is a significant increase of 33% in the efflux activity of ABC proteins ($P=0.040$; $n=4$) compared to control (100%), as shown in Figure 3.

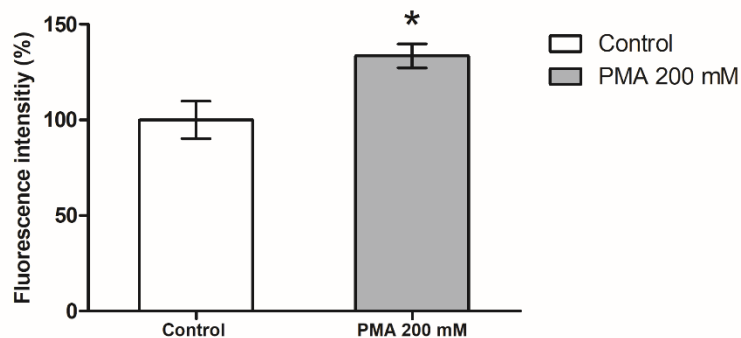


Figure 3: Rhodamine B efflux (% fluorescence) as indicative of ABC protein activity in zebrafish hepatocytes. The bars represent the means (\pm SE) of the fluorescence intensity of Rhodamine B released (at the end of 1h) by cells exposed to PMA (200mM), values are expressed as a percentage (%) in relation to the control (100%). * indicates significant difference ($p \leq 0.05$) between groups.

Discussion

The present study was conducted based on the hypothesis that there is a correlation between the availability of calcium and the level of activity of ABC. An attempt was made to promote experimental conditions where cells of the ZF-L lineage underwent “transient” calcium changes and, simultaneously, the efflux activity of these pumps was evaluated.

Calcium signaling patterns vary as a function of time and cell location. To trigger short-term responses such as signaling in transport proteins, transient variations of this ion are sufficient for the message to travel through the cellular environment (Berridge et al., 2000). However, this is only possible if there is an influx of calcium from the extracellular environment through channels (or carrier proteins) and/or from the release by the stock organelles (Stutzmann and Mattson, 2011).

Ryanodine receptors (RyR) are calcium channels present in the membrane of the endoplasmic reticulum that support a wide variety of calcium signaling events and have calcium itself as a fundamental requirement for the serial activation of other similar channels in the organelle, although other compounds can modulate this release (Stutzmann and Mattson, 2011). Caffeine is a molecule widely used in *in vitro* studies due to its ability to promote an increase in the cytoplasmic level of calcium through the modulation (activation) of RyRs, as described by Kong and collaborators (2008) in the HEK-293 lineage (human embryonic kidney cells). Such calcium release in response to the presence of Caffeine has also been described in dorsal root ganglion neurons of rats (Usachev et al., 1993), cells of the HeLa lineage (Rojo-Ruiz et al., 2018) and taste receptor cells of papillae of rat (Zhao et al., 2002).

By exposing the hepatocytes to Caffeine, we observed that the efflux of this group of cells increased significantly by 68% (Figure 1), demonstrating a likely positive relationship between the increase in cytosolic calcium concentration and the efflux of ABCs. Studies suggest that cellular processes such as ischemic, neurodegenerative (Begley et al., 1999; Bers, 2006) and cell proliferative (Yang and Huang, 2005) disorders have signaling and increased calcium availability as key elements. Qosa et al. (2012), investigating the clearance of β -amyloid via ABCB1 in the brain of C57BL rats exposed to Caffeine, observed that the efflux rate of this transporter increased by 20% when compared to the control group, corroborating the data from our work. The increase in

efflux activity observed by these authors lists Caffeine as a substance with potential ABC activator, however, the mechanism behind this stimulant effect was not investigated by them.

By exposing the cells to the calcium-free efflux solution, plus 1mM of the calcium chelator EGTA (Zero Calcium) (Figure 2A), we correlated the absence of extracellular calcium to the regulatory process of an intracellular event. In many cell types, calcium release mediated by receptors from internal stores is followed and dependent on calcium influx, therefore, as described by Hoth and Penner (1992) we used EGTA in the zero calcium condition to assess whether there is dependence on extracellular calcium in the ABC efflux activity. In cells exposed to conditions that aimed to limit the availability of calcium, the efflux of ABC was maintained, thus showing no variation in its transport activity (Figure 2).

In order to assess whether the limitation of intracellular calcium reflected on the efflux activity of ABCs and, above all, whether the reticulum was the source of calcium in this model, we used the agent Dantrolene at a concentration of 10mM (Figure 2B). Dantrolene is a ryanodine receptor antagonist used in the clinical treatment of malignant hyperthermia due to its blocking action of the calcium channels of the sarcoid/endoplasmic reticulum, which consequently promotes a decrease in the cytosolic calcium concentration (Diszházi et al., 2019).

In vitro, its ability to limit calcium availability is appreciated in neurophysiological studies of diseases whose pathophysiology is based on cytotoxic calcium concentrations. Essays such as those by Charles et al. (1993) point out that the neuroprotective effect of Dantrolene on rat glial cells is due to the effect of decreasing the release and subsequent intracellular accumulation of calcium. Frandsen and Schousboe (1991) similarly observed that Dantrolene was able to bypass calcium-induced cell damage via glutamate in rat cortical neurons.

The unaltered efflux rate among the conditions that aimed to assess the ABC activity under low calcium availability was also observed in cells exposed to 5 μ M of Bapta-AM (Figure 2 C). This substance, widely used in *in vitro* assays as a selective calcium chelator, has the potential to change the dynamics of calcium by binding to free ions in the cytosol, promoting a reduction in its cytoplasmic concentration.

Works with Bapta-AM describe the effects of cytoplasmic calcium reduction under the effect of this chelator in different lineages, such as tumor cells of the MCF-7 lineage (human breast cancer cells) (Hodeify et al., 2021) and rat keratinocytes (Li et al., 1995). In renal epithelial cells (LLC-PK1), Kawai et al (2006) report that exposure to Bapta-AM for 1h suppressed the calcium elevation related to cisplatin and in human astrocytes (GHA) calcium chelation by Bapta- AM partially inhibits cell death induced by disturbances in calcium homeostasis caused by the synthetic pyrethroid lambda-cyhalothrin (Hsu et al., 2018). In our study, the reduction of free calcium by Bapta-AM did not change the efflux activity of ABC in the ZF-L strain.

The other hypothesis tested in this study involving calcium signaling was the exposure of cells to PMA at a concentration of 200mM, known as PKC activator. Exposure to PMA promoted a 33% increase in the level of ABC activity (Figure 3), suggesting phosphorylation via PKC as a possible constituent of the ABC activation signaling pathway in the ZF-L lineage. Conventional (calcium-dependent) isoforms of PKC have in their structure binding sites for calcium and diacylglycerol, with PMA being a diacylglycerol agonist, this agent binds to the C1 domain of PKC, promoting its activation (Cooke et al., 2018).

Our results with PMA corroborate the data found in the literature for other cell models. A significant increase in efflux activity via ABCB1 associated with an increase in PKC activity was observed in cells expressing the MDR phenotype of human adenocarcinoma MCF-7 stimulated with 200mM PMA for 2.5h by Fine et al. (1988).

Results that assess the ABC activity with PMA in cells that do not express the MDR phenotype and assess the basal activity of ABCs, as proposed in this study, are described by Watanabe et al. (2019). When evaluating the effect of phosphorylation via α PKC on ABCG1 transporters expressed in HEK293 and Raw264.7 strains, these authors observed that the activation of α PKC isoenzymes by phorbol esters promoted an increase in cholesterol efflux as well as a blockade of PKC activity suppressed ABC activity in these cells, concluding, therefore, that phosphorylation via α PKC is related to transporter function.

Our results, which evaluated the efflux activity of ABC under conditions of low calcium availability, suggest that hepatocytes somehow support ABC activation under conditions of low calcium availability in both intracellular and extracellular

environments. We emphasize, however, that the results with Caffeine and PMA indicate that calcium elevations seem to be present in the signaling pathway of activation of ABC transporters in the ZF-L lineage.

The precise mechanism of activation of ABC transporters remains in dispute in cellular and animal models studied to date, however, calcium dependence is a possibility. The results involving PKC in zebrafish hepatocytes reinforce the data available in the literature for other cell lines, thus narrowing the lines of investigation that seek to trace the signaling pathway for the activation of ABC transporters.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES - Finance Code 001), E.C. Lima was Master fellow and F. M. Lopes was a postdoc fellow from the CAPES. Marta M. Souza is a research fellow from the Brazilian CNPq (Proc. #314776/2020-6).

References

- Bard, S. (2000). Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389.
- Barancík, M., Poleková, L., Mrázová, T., Breier, A., Stankovicová, T., Slezák, J. (1994). Reversal effects of several Ca²⁺-entry blockers, neuroleptics and local anaesthetics on P-glycoprotein-mediated vincristine resistance of L1210/VCR mouse leukaemic cell line. *Drugs Exp. Clin. Res.* 20, 13–18.
- Bates, S.E., Lee, J.S., Dickstein, B., Spolyar, M., Fojo, A.T. (1993). Differential modulation of P-glycoprotein transport by protein kinase inhibition. *Biochemistry* 32, 9156–9164.
- Begley, J.G., Duan, W., Chan, S., Duff, K., Mattson, M.P. (1999). Altered Calcium Homeostasis and Mitochondrial Dysfunction in Cortical Synaptic Compartments of Presenilin-1 Mutant Mice. *J. Neurochem.* 72, 1030–1039.
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11–21.
- Bers, D.M. (2006). Altered cardiac myocyte Ca²⁺ regulation in heart failure. *Physiol. Bethesda Md* 21, 380–387.
- Blobe, G.C., Sachs, C.W., Khan, W.A., Fabbro, D., Stabel, S., Wetsel, W.C., Obeid, L.M., Fine, R.L., Hannun, Y.A. (1993). Selective regulation of expression of protein kinase C (PKC) isoenzymes in multidrug-resistant MCF-7 cells. Functional significance of enhanced expression of PKC alpha. *J. Biol. Chem.* 268, 658–664.
- Borst, P., Schinkel, A.H. (1997). Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends Genet. TIG* 13, 217–222.
- Caminada, D. (2008). Pharmaceuticals as environmental pollutants: cytotoxicity and biochemical effects in an in vitro model system for aquatic organism .
- Charles, A.C., Dirksen, E.R., Merrill, J.E., Sanderson, M.J. (1993). Mechanisms of intercellular calcium signaling in glial cells studied with dantrolene and thapsigargin. *Glia* 7, 134–145.

- Collatz, M.B., Rüdél, R., Brinkmeier, H. (1997). Intracellular calcium chelator BAPTA protects cells against toxic calcium overload but also alters physiological calcium responses. *Cell Calcium* 21, 453–459.
- Cooke, M., Zhou, X., Casado-Medrano, V., Lopez-Haber, C., Baker, M.J., Garg, R., Ann, J., Lee, J., Blumberg, P.M., Kazanietz, M.G. (2018). Characterization of AJH-836, a diacylglycerol-lactone with selectivity for novel PKC isozymes. *J. Biol. Chem.* 293, 8330–8341.
- Cornwall, R., Toomey, B.H., Bard, S., Bacon, C., Jarman, W.M., Epel, D., (1995). Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. *Aquat. Toxicol.* 31, 277–296.
- Davidson, A.L. (2002). Mechanism of Coupling of Transport to Hydrolysis in Bacterial ATP-Binding Cassette Transporters. *J. Bacteriol.* 184, 1225–1233.
- Dean, M., Annilo, T. (2005). Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6, 123–142.
- Diszházi, G., Magyar, Z.É., Mótyán, J.A., Csernoch, L., Jóna, I., Nánási, P.P., Almássy, J., (2019). Dantrolene Requires Mg^{2+} and ATP To Inhibit the Ryanodine Receptor. *Mol. Pharmacol.*
- Ferreira, M., Costa, J., Reis-Henriques, M.A. (2014). ABC transporters in fish species: a review. *Front. Physiol.* 5, 266.
- Fine, R.L., Patel, J., Chabner, B.A. (1988). Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 582–586.
- Germann, U.A. (1996). P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 32A, 927–944.
- Germann, U.A. (1993). Molecular analysis of the multidrug transporter. *Cytotechnology* 12, 33–62.
- Ghosh, C., Zhou, Y.L., Collodi, P. (1994). Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 167–176.

- Guidony, N.S., Scaini, J.L.R., Oliveira, M.W.B., Machado, K.S., Bastos, C., Escarrone, A.L., Souza, M.M. (2021). ABC proteins activity and cytotoxicity in zebrafish hepatocytes exposed to triclosan. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 271, 116368.
- Goulart, T.L.S., Boyle, R.T., Souza, M.M. (2015). Cytotoxicity of the association of pesticides Roundup Transorb® and Furadan 350 SC® on the zebrafish cell line, ZF-L. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 29, 1377–1384.
- Hodeify, R., Siddiqui, S.S., Matar, R., Vazhappilly, C.G., Merheb, M., Al Zouabi, H., Marton, J. (2021). Modulation of calcium-binding proteins expression and cisplatin chemosensitivity by calcium chelation in human breast cancer MCF-7 cells. *Heliyon* 7, e06041.
- Hoth, M., Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353–356.
- Hsu, S.-S., Jan, C.-R., Liang, W.-Z. (2018). The investigation of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin (LCT)-affected Ca²⁺ homeostasis and -activated Ca-associated mitochondrial apoptotic pathway in normal human astrocytes: The evaluation of protective effects of BAPTA-AM (a selective Ca²⁺ chelator). *NeuroToxicology* 69, 97–107.
- Kawai, Y., Nakao, T., Kunimura, N., Kohda, Y., Gemba, M. (2006). Relationship of Intracellular Calcium and Oxygen Radicals to Cisplatin-Related Renal Cell Injury. *J. Pharmacol. Sci.* 100, 65–72.
- Kong, H., Jones, P.P., Koop, A., Zhang, L., Duff, H.J., Chen, S.R.W., (2008). Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor. *Biochem. J.* 414, 441–452.
- Kurelec, B., Smital, T., Pivèevia, B., Eufemia, N., Epel, D., (2000). Multixenobiotic Resistance, P-Glycoprotein, and Chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9, 307–327.
- Li, L., Tucker, R.W., Hennings, H., Yuspa, S.H. (1995). Chelation of intracellular Ca²⁺ inhibits murine keratinocyte differentiation in vitro. *J. Cell. Physiol.* 163, 105–114.
- Osada, S., Okano, Y., Saji, S., Nozawa, Y. (1994). Spontaneous Ca²⁺ release from a caffeine and ryanodine-sensitive intracellular Ca²⁺ store in freshly prepared hepatocytes. *Hepatology* 19, 514–517.

- Qosa, H., Abuznait, A.H., Hill, R.A., Kaddoumi, A. (2012). Enhanced brain amyloid- β clearance by rifampicin and caffeine as a possible protective mechanism against Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 31, 151–165.
- Riordan, J.R., Ling, V. (1979). Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J. Biol. Chem.* 254, 12701–12705.
- Rojo-Ruiz, J., Rodríguez-Prados, M., Delrio-Lorenzo, A., Alonso, M.T., García-Sancho, J. (2018). Caffeine chelates calcium in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 475, 3639–3649.
- Slatter, C.A.B., Kanji, H., Coutts, C.A., Ali, D.W. (2005). Expression of PKC in the developing zebrafish, *Danio rerio*. *J. Neurobiol.* 62, 425–438.
- Stutzmann, G.E., Mattson, M.P. (2011). Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Handling in Excitable Cells in Health and Disease. *Pharmacol. Rev.* 63, 700–727.
- Stolarczyk, E., Reiling, C., Paumi, C. (2010). Regulation of ABC Transporter Function Via Phosphorylation by Protein Kinases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 621–35.
- Thomas, H., Coley, H.M. (2017). Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein. *Cancer Control* 10.
- Tsuruoka, S., Sugimoto, K., Fujimura, A., Imai, M., Asano, Y., Muto, S. (2001). Protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase independently contribute to P-glycoprotein-mediated drug secretion in the mouse proximal tubule. *Pflugers Arch.* 442, 321–328
- Usachev, Y., Shmigol, A., Pronchuk, N., Kostyuk, P., Verkhratsky, A. (1993). Caffeine-induced calcium release from internal stores in cultured rat sensory neurons. *Neuroscience* 57, 845–859.
- Watanabe, T., Kioka, N., Ueda, K., Matsuo, M. (2019). Phosphorylation by protein kinase C stabilizes ABCG1 and increases cholesterol efflux. *J. Biochem. (Tokyo)* 166, 309–315.
- Witek, P., Korga, A., Burdan, F., Ostrowska, M., Nosowska, B., Iwan, M., Dudka, J. (2016). The effect of a number of H9C2 rat cardiomyocytes passage on repeatability of cytotoxicity study results. *Cytotechnology* 68, 2407–2415.

Yang, S., Huang, X.-Y. (2005). Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J. Biol. Chem.* 280, 27130–27137.

Zhao, F.-L., Lu, S.-G., Herness, S. (2002). Dual actions of caffeine on voltage-dependent currents and intracellular calcium in taste receptor cells. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R115–R129.

DISCUSSÃO GERAL

Sendo as ABCs um elemento da desintoxicação celular e também um obstáculo a ser superado em muitos tratamentos farmacológicos contra o câncer humano e animal, é razoável que a compreensão da biologia destes transportadores seja um importante campo de pesquisa. O ponto central deste trabalho visou, portanto, buscar indícios que nos aproximem um pouco mais da elucidação dos mecanismos por traz da ativação das proteínas ABC. Levando em consideração o apanhado de informações preciosas porém dispersas sobre o assunto que dispomos na literatura até o presente momento, correlacionamos assim dados sobre diferentes pesquisas e elencamos a nossa base de investigação.

É indiscutível o quanto o íon cálcio é elementar à vida, que vai do processo de formação de um novo ser até o momento da sua morte, participando indissociavelmente dos processos de manutenção da existências sob os mais variados aspectos moleculares. Ao avaliar a dependência do cálcio na ativação das ABCs em hepatócitos de *zebrafish*, seguimos na corrida dos trabalhos que buscam traçar essa via, porém com um aspecto singular e inexplorado até o momento.

Nossos resultados nas condições que objetivaram limitar ao máximo a disponibilidade de cálcio nos meio intracelular e extracelular, dá indícios que o bloqueio de cálcio em pontos específicos da célula, como os que foram avaliados neste estudo, não são suficientes para inibir a atividade de efluxo das ABCs, como ocorre com os fármacos bloqueadores dos canais de cálcio. Esses resultados, entretanto, levantam outras duas hipóteses: 1 o cálcio não participa da via de sinalização das ABCs; 2 o cálcio participa da via de sinalização das ABCs porém as células foram capazes de sustentar a demanda mínima para a manutenção da atividade dos transportadores nas condições experimentais deste estudo.

Acreditamos que a primeira hipótese foi negada com os resultados que obtivemos a partir da utilização de cafeína. A segunda hipótese, por sua vez, torna-se a mais provável, dado que o retículo endoplasmático não é o único estoque intracelular de cálcio e também pelo fato de que há pouquíssimo cálcio ionizado livre no citosol. Para melhor compreensão dos eventos celulares, a marcação com sondas fluorescentes de cálcio podem ser utilizadas para a confirmação em estudos posteriores, assim como a participação de outras organelas reservatórias de cálcio.

Os experimentos com a cafeína, utilizada com o intuito de promover uma elevação maciça na concentração citosólica de cálcio nos deram os primeiros indícios de que a atividade de transporte das ABCs pode estar relacionada ao aumento na concentração citoplasmática de cálcio, gerando uma nova pergunta: como? O cálcio enquanto segundo mensageiro intracelular atua por meio da sua ligação a proteínas específicas, como as isoformas dependentes de cálcio da PKC dentre outras proteínas. Supomos então que a manipulação farmacológica com cafeína, ao liberar cálcio do retículo endoplasmático poderia estar promovendo uma ativação das PKCs convencionais. Esse questionamento tem como base, sobretudo, dados de outros modelos celulares que sustentam a fosforilação via PKC como mecanismo constituinte mas não único e definitivo das ABCs.

Com base nisto, utilizamos uma ferramenta farmacológica que modula diretamente a atividade de PKC, o PMA. O PMA é um éster de forbol que mimetiza potentemente a função do ligante endógeno diacilglicerol, ou seja, o PMA liga-se no sítio C1 das PKCs que possuem esse local (neste caso, as mesmas dependente de cálcio) tornando-as ativas. Ao incrementarmos a atividade das PKC pelo PMA observamos, assim como na condição experimental com cafeína, o aumento significativo na atividade de efluxo dos transportadores ABC. Nossos dados apontam, portanto, uma condição que já é relatada em outros modelos celulares que não a linhagem ZF-L, a qual sugere que a fosforilação via PKC participa da sinalização nestes transportadores.

O que nossos resultados trazem de forma complementar a outros estudos nesta linha de pesquisa, é a investigação partindo do cálcio enquanto segundo mensageiro e mais ainda, o quanto a ausência deste íon tem potencial para alterar ou não a atividade das proteínas ABC. O esclarecimento destas questões pode contribuir para estudos farmacológicos na área de oncologia, onde as ABC são extensivamente estudadas e também na toxicologia ambiental, dado que xenobióticos com potencial para modular a atividade das ABCs são presentes nos mais variados ambientes aquáticos afetados pela poluição, e muitos contaminantes tem potencial para afetar a homeostase do cálcio nas células dos organismos.

REFERÊNCIAS GERAIS

- Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramach, M., Pastan, I., Gottesman, M.M., 1999. Biochemical, Cellular, and Pharmacological Aspects of the Multidrug. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 361-98
- Barancík, M., Poleková, L., Mrázová, T., Breier, A., Stankovicová, T., Slezák, J. 1994. Reversal effects of several Ca⁽²⁺⁾-entry blockers, neuroleptics and local anaesthetics on P-glycoprotein-mediated vincristine resistance of L1210/VCR mouse leukaemic cell line. *Drugs Exp. Clin. Res.* 20, 13–18
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11–21
- Blobe, G.C., Sachs, C.W., Khan, W.A., Fabbro, D., Stabel, S., Wetsel, W.C., Obeid, L.M., Fine, R.L., Hannun, Y.A., 1993. Selective regulation of expression of protein kinase C (PKC) isoenzymes in multidrug-resistant MCF-7 cells. Functional significance of enhanced expression of PKC alpha. *J. Biol. Chem.* 268, 658–664
- Caminada, D., Zaja, R., Smital, T., Fent, K., 2008. Human pharmaceuticals modulate P-gp1 (ABCB1) transport activity in the fish cell line PLHC-1. *Aquat. Toxicol.* 90, 214–222
- Clapham, D.E., 2007. Calcium signaling. *J. Cell* 131, 1047–1058
- Cooper, P.S., 1999. Altered expression of the xenobiotic transporter P-glycoprotein in liver and liver tumours of mummichog *Fundulus heteroclitus* from a creosote-contaminated environment. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 4, 48–58
- Dean, M., Annilo, T., 2005. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6, 123–142
- Efferth, T., Volm, M., 2017. Multiple resistance to carcinogens and xenobiotics: P-glycoproteins as universal detoxifiers. *Arch. Toxicol.* 91, 2515–2538

- Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C.N., Macmanus-Spencer, L.A., Hamdoun, A., Smital, T., 2008. Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3914–3920
- Fletcher, J.I., Williams, R.T., Henderson, M.J., Norris, M.D., Haber, M., 2016. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resist. Updat.Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 26, 1–9
- Ge, S., Mp, M., 2011. Endoplasmic reticulum Ca(2+) handling in excitable cells in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 63Higgins, C.F., Linton, K.J., 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 918–926
- Gupta, S.K., Singh, P., Ali, V., Verma, M., 2020. Role of membrane-embedded drug efflux ABC transporters in the cancer chemotherapy. *Oncol. Rev.* 14, 448
- Jaramillo, A.C., Saig, F.A., Cloos, J., Jansen, G., Peters, G.J., 2018. How to overcome ATP-binding cassette drug efflux transporter-mediated drug resistance? *Cancer Drug Resist.* 1, 6–29
- Jeong, C.-B., Kim, H.-S., Kang, H.-M., Lee, J.-S., 2017. ATP-binding cassette (ABC) proteins in aquatic invertebrates: Evolutionary significance and application in marine ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 185, 29–39
- Karlstad, J., Sun, Y., Singh, B.B., 2012. Ca²⁺ signaling: an outlook on the characterization of Ca²⁺ channels and their importance in cellular functions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 740, 143–157
- Kurelec, B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 23–43
- Lelong-Rebel, I.H., Cardarelli, C.O., 2005. Differential phosphorylation patterns of P-glycoprotein reconstituted into a proteoliposome system: insight into additional unconventional phosphorylation sites. *Anticancer Res.* 25, 3925–3935
- Luckenbach, T., Fischer, S., Sturm, A., 2014. Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 165, 28–52
- Lopes, F.M., Sandrini, J.Z., Souza, M.M., 2018. Toxicity induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in the zebrafish hepatocyte cell line (ZF-L). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 162, 201–207

- Marchi, S., Patergnani, S., Missiroli, S., Morciano, G., Rimessi, A., Wieckowski, M.R., Giorgi, C., Pinton, P., 2018. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium* 69, 62–72
- Mayati, A., Moreau, A., Le Vée, M., Stieger, B., Denizot, C., Parmentier, Y., Fardel, O., 2017. Protein Kinases C-Mediated Regulations of Drug Transporter Activity, Localization and Expression. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 764
- Mealey, K.L., Fidel, J., 2015. P-glycoprotein mediated drug interactions in animals and humans with cancer. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 1–6
- Miller, D.S., 2010. Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 246–254
- Muzi, M., Mankoff, D.A., Link, J.M., Shoner, S., Collier, A.C., Sasongko, L., Unadkat, J.D., 2009. Imaging of Cyclosporine Inhibition of P-Glycoprotein Activity Using ¹¹C-Verapamil in the Brain: Studies of Healthy Humans. *J. Nucl. Med.* 50, 1267–1275
- Paolini, A., Baldassarre, A., Del Gaudio, I., Masotti, A., 2015. Structural Features of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ABCA3. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 19631–19644
- Riordan, J.R., Ling, V., 1979. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J. Biol. Chem.* 254, 12701–12705
- Silva, B.V., Horta, B.A.C., Alencastro, R.B. de, Pinto, A.C., 2009. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Quím. Nova* 32, 453–462
- Scott, J.D., Pawson, T., 2009. Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science* 326, 1220–1224
- Sharom, F.J., 1997. The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J. Membr. Biol.* 160, 161–175
- Slatter, C.A.B., Kanji, H., Coutts, C.A., Ali, D.W., 2005. Expression of PKC in the developing zebrafish, *Danio rerio*. *J. Neurobiol.* 62, 425–438
- Thomas, H., Coley, H.M., 2003. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein. *Cancer Control* 10, 159–165

Urabe, T., Yanase, Y., Motoike, S., Harada, K., Hide, I., Tanaka, S., Tsutsumi, Y.M., Kawamoto, M., Sakai, N., 2020. Propofol induces the elevation of intracellular calcium via morphological changes in intracellular organelles, including the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Eur. J. Pharmacol.* 884, 173303

Wilkins, S., 2015. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime Rep.* 7, 14

Wu-Zhang, A.X., Newton, A.C., 2013. Protein Kinase C Pharmacology: Refining the Toolbox. *Biochem. J.* 452, 195–209.