



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V
CENTRO MINISTRO ALCIDES CARNEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS - CCBSA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

LÍLIAN CRISTINA BALINT PEREIRA

**EXPRESSÃO DO FENÓTIPO MXR EM *Emerita almeidai* (CRUSTACEA:
HIPPIDAE): POTENCIAL BIOINDICADOR EM ECOSISTEMAS DE PRAIAS
ARENOSAS**

**JOÃO PESSOA
2025**

LÍLIAN CRISTINA BALINT PEREIRA

EXPRESSÃO DO FENÓTIPO MXR EM *Emerita almeidai* (CRUSTACEA: HIPPIDAE): POTENCIAL BIOINDICADOR EM ECOSISTEMAS DE PRAIAS ARENOSAS

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo original) apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ecofisiologia animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Enelise Marcelle Amado.

**JOÃO PESSOA
2025**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto em versão impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que, na reprodução, figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

P436e Pereira, Lilian Cristina Balint.

Expressão do fenótipo mxr em *Emerita almeidai* (crustacea, hippidae): potencial bioindicador em ecossistemas de praias arenosas [manuscrito] / Lilian Cristina Balint Pereira. - 2025.
38 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2025.

"Orientação : Prof. Dra. Enelise Marcelle Amado, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA".

1. *Emerita almeidai*. 2. Fenótipo de Resistência a Multixenobióticos (MXR). 3. Rodamina-B. 4. Glicoproteína P (P-gp). 5. MK571. 6. Cloridrato de verapamil. I. Título

21. ed. CDD 639.5

LÍLIAN CRISTINA BALINT PEREIRA

EXPRESSÃO DO FENÓTIPO MXR EM *Emerita almeidai* (CRUSTACEA:
HIPPIDAE): POTENCIAL BIOINDICADOR EM ECOSISTEMAS DE PRAIAS
ARENOSAS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharela
em Ciências Biológicas

Aprovada em: 06/06/2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado eletronicamente por:

- **Elvio Sergio Figueredo Medeiros** (***.188.234-**), em **26/06/2025 15:13:06** com chave **352935dc52b911f0be6406adb0a3afce**.
- **Bruna Carolline Honório Lopes** (***.479.004-**), em **26/06/2025 15:11:26** com chave **f9a02e4452b811f0b8d606adb0a3afce**.
- **Enelise Marcelle Amado** (***.608.919-**), em **26/06/2025 15:11:56** com chave **0b7bf91852b911f095461a7cc27eb1f9**.

Documento emitido pelo SUAP. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QrCode ao lado ou acesse https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar_documento/ e informe os dados a seguir.

Tipo de Documento: Folha de Aprovação do Projeto Final

Data da Emissão: 26/06/2025

Código de Autenticação: a44e82



A mim mesma, pela persistência,
disciplina e esforço, DEDICO.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema representativo do funcionamento do mecanismo das proteínas transportadoras ABC.....	10
Figura 2 – Representação esquemática do funcionamento do ensaio do acúmulo de rodamina-B.....	13
Figura 3 – Registros fotográficos do <i>Emerita almeidai</i> utilizado na atual pesquisa.....	15
Figura 4 – Amostras das brânquias do <i>Emerita almeidai</i> vistas ao microscópio.....	16
Figura 5 – Mapa dos pontos de coleta em duas praias de João Pessoa e uma de Cabedelo - PB.....	17
Figura 6 – Registro fotográfico do período de aclimatação do <i>E. almeidai</i> em laboratório.....	18
Figura 7 – Desenho experimental das metodologias <i>in vitro</i> utilizadas nesta pesquisa.....	19
Figura 8 – Registro fotográfico do <i>Emerita almeidai</i> durante a exposição aos metais em salinidade reduzida.....	20
Figura 9 – Desenho experimental das metodologias <i>in vivo</i> utilizadas nesta pesquisa.....	21
Gráfico 1 – Gráfico do efeito dos inibidores no ensaio de acúmulo de rodamina-B nas brânquias do <i>E. almeidai</i>	22
Gráfico 2 – Gráfico do efeito dos metais no ensaio de acúmulo de rodamina-B nas brânquias do <i>E. almeidai</i>	24
Gráfico 3 – Gráfico do efeito da interação entre o metal e o inibidor nas brânquias do <i>E. almeidai</i>	26
Gráfico 4 – Gráfico do efeito da redução de salinidade no ensaio de acúmulo da rodamina-B nas brânquias do <i>E. almeidai</i>	27
Gráfico 5 – Gráfico do efeito dos metais combinado à redução de salinidade no ensaio de acúmulo de rodamina-B nas brânquias do <i>E. almeidai</i>	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP Binding Cassette
ABCB	ATP Binding Cassette B
ABCC	ATP Binding Cassette C
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
ATPase	Adenosina Trifosfatase
Cd	Cádmio
Cu	Cobre
DNA	Deoxyribonucleic Acid
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LEFA	Laboratório de Ecofisiologia Animal
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas
MK	MK571
MRP	Proteína de Resistência à Múltiplas Drogas
MXR	Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos
NBDs	Domínios de Ligação de Nucleotídeos
NBD1	Domínio de Ligação de Nucleotídeos 1
NBD2	Domínio de Ligação de Nucleotídeos 2
PB	Paraíba
PBS	Phosphate Buffered Saline
P-gp	Glicoproteína-P ou Glicoproteína de Permeabilidade
Pi	Fosfato Inorgânico
RPM	Rotação por Minuto
SIRGAS	Sistema de Referência Geocêntrico para as Américas
TMDs	Domínios Transmembrana
TMD1	Domínio Transmembrana 1
TMD2	Domínio Transmembrana 2
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
URF	Unidades Relativas de Fluorescência
UTM	Universal Transverse Mercator
V; VE	Cloridrato de verapamil

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramma
L	Litro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milimetro
nm	Nanômetro
µg	Microgramma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
=	Igual
‰	Permil
>	Maior
<	Menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	16
3	METODOLOGIA	16
3.1	Local de coleta	16
3.2	Coleta e manutenção dos animais	17
3.3	Ensaio <i>in vitro</i> do efeito da inibição de bombas de efluxo relacionadas ao fenótipo MXR	18
3.4	Ensaio <i>in vitro</i> do efeito de metais sobre o acúmulo de rodamina-B	19
3.5	Ensaio <i>in vivo</i> do efeito de metais isoladamente ou combinados com variação de salinidade.....	20
3.6	Análise estatística.....	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
4.1	Efeitos dos inibidores no acúmulo de rodamina-B.....	22
4.2	Efeito de metais no acúmulo de rodamina-B.....	24
4.3	Efeito da interação entre metal e inibidor.....	25
4.4	Efeito da redução de salinidade no ensaio de acúmulo de rodamina-B.....	27
4.5	Efeito de metais combinado à redução de salinidade.....	28
5	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	31

EXPRESSÃO DO FENÓTIPO MXR EM *Emerita almeidai* (CRUSTACEA: HIPPIDAE): POTENCIAL BIOINDICADOR EM ECOSISTEMAS DE PRAIAS ARENOSAS

EXPRESSION OF THE MXR PHENOTYPE IN *Emerita almeidai* (CRUSTACEA: HIPPIDAE): POTENTIAL BIOINDICATOR IN SANDY BEACH ECOSYSTEMS

Lílian Cristina Balint Pereira^{1*}
Enelise Marcelle Amado^{2**}

RESUMO

A identificação precoce dos efeitos da contaminação ambiental em organismos aquáticos é fundamental para a conservação dos ecossistemas. Nesse contexto, o fenótipo de resistência à multixenobióticos (MXR) é um mecanismo de defesa celular amplamente reconhecido como biomarcador de contaminação aquática, que promove o bombeamento de substratos exógenos e endógenos para fora das células dos organismos. *Emerita almeidai*, é uma espécie de crustáceo bastante abundante e com grande potencial para o biomonitoramento das praias arenosas, e que, até o momento, não possui nenhum trabalho investigando o fenótipo MXR nessa espécie. Para identificar a atividade desse fenótipo na espécie, foram realizados ensaios *in vitro* de acúmulo de rodamina-B na presença dos inibidores para as bombas de efluxo do mecanismo: cloridrato de verapamil (específico para a P-gp) e o MK571 (característico para a MRP). Além disso, o ensaio de acúmulo de rodamina-B foi realizado sob a influência de metais, como cádmio e cobre, bem como em duas diferentes salinidades, avaliadas isoladamente e em combinação com os metais, a fim de investigar possíveis interações desses fatores com as proteínas que medeiam da atividade MXR. Esse ensaio consiste na medição da fluorescência emitida pelas células que acumularam e expulsaram a rodamina-B durante as exposições com os inibidores, metais pesados e salinidade reduzida. Os resultados indicaram que não houve diferenças significativas no acúmulo de rodamina-B quando os inibidores foram testados, nem diante de exposição aos metais. No entanto, no ensaio *in vivo* quando o metal foi combinado com a redução de salinidade, houve um aumento significativo do acúmulo de rodamina-B nas células branquiais do *Emerita almeidai*. Este estudo indicou que o *Emerita almeidai* não expressou o fenótipo MXR nas condições analisadas, sugerindo limitações ao seu uso como bioindicador em praias arenosas. Recomenda-se a necessidade de realização de novos testes com outros inibidores e condições experimentais para avaliar seu real potencial como bioindicador.

Palavras-Chave: rodamina-B; cloridrato de verapamil; MK571; P-gp; metais pesados.

^{1*} Aluna de graduação em Ciências Biológicas da UEPB, lilian.pereira@aluno.uepb.edu.br.

^{2**}Prof^a. Dr^a. do curso de Ciências Biológicas da UEPB, eneliseamado@servidor.uepb.edu.br.

ABSTRACT

Early identification of the effects of environmental contamination on aquatic organisms is essential for the conservation of ecosystems. In this context, the multixenobiotic resistance (MXR) phenotype is a cellular defense mechanism widely recognized as a biomarker of aquatic contamination, which promotes the pumping of exogenous and endogenous substrates out of the cells of organisms. *Emerita almeidai* is a very abundant crustacean species with great potential for biomonitoring of sandy beaches, and to date, there has been no study investigating the MXR phenotype in this species. To identify the activity of this phenotype in the species, *in vitro* rhodamine-B accumulation assays were performed in the presence of inhibitors for the efflux pumps of the mechanism: verapamil hydrochloride (specific for P-gp) and MK571 (characteristic for MRP). Furthermore, the rhodamine-B accumulation assay was performed under the influence of metals, such as cadmium and copper, as well as at two different salinity concentrations, evaluated alone and in combination with the metals, in order to investigate possible interactions of these factors with the proteins that mediate MXR activity. This assay consists of measuring the fluorescence emitted by cells that accumulated and expelled rhodamine-B during exposure to inhibitors, heavy metals and reduced salinity. The results indicated that there were no significant differences in rhodamine-B accumulation when the inhibitors were tested, nor when exposed to the metals. However, in the *in vivo* assay when the metal was combined with salinity reduction, there was a significant increase in rhodamine-B accumulation in the gill cells of *Emerita almeidai*. This study indicated that *Emerita almeidai* did not express the MXR phenotype under the conditions analyzed, suggesting limitations to its use as a bioindicator on sandy beaches. It is recommended that new tests be carried out with other inhibitors and experimental conditions to evaluate its real potential as a bioindicator.

Keywords: rhodamine-B; verapamil hydrochloride; MK571; P-gp; heavy metals.

1 INTRODUÇÃO

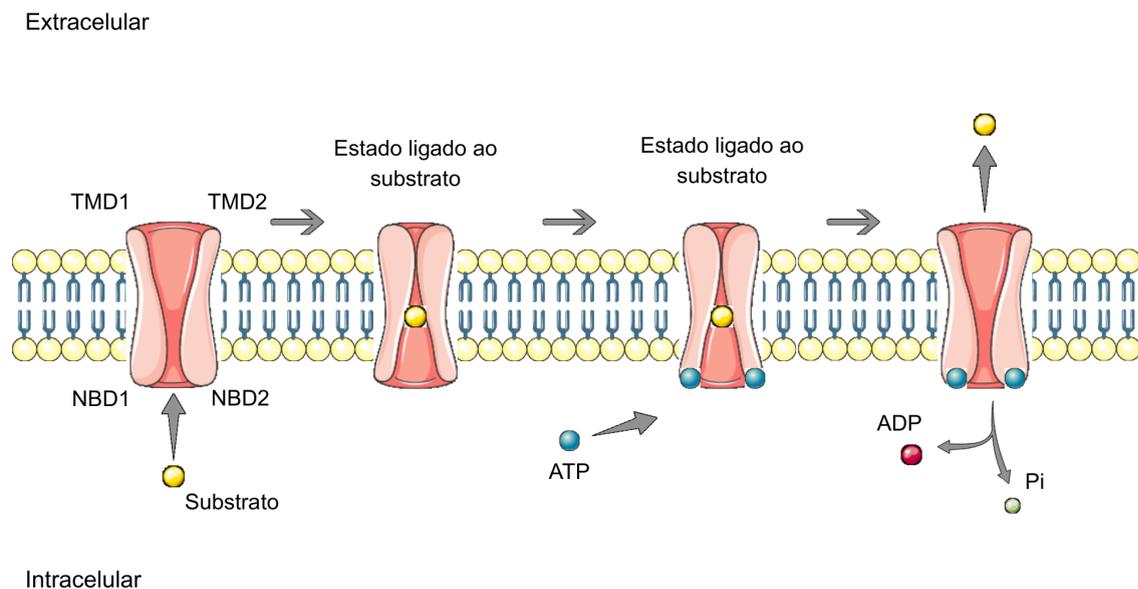
A identificação precoce dos efeitos da contaminação ambiental em organismos aquáticos é fundamental para a conservação dos ecossistemas. Nesse contexto, biomarcadores têm se destacado como ferramentas sensíveis para detectar alterações biológicas em indivíduos de espécies que precedem impactos nas dinâmicas populacionais (Hook *et al.*, 2014; De Coen *et al.*, 2000). Biomarcadores são alterações bioquímicas, moleculares, celulares, ou fisiológicas que podem ser medidas em amostras de tecidos ou fluidos corpóreos de um organismo, permitindo não apenas indicar a exposição de organismos a contaminantes, mas também evidenciar possíveis efeitos adversos (Walker *et al.*, 2012). Diversas respostas biológicas já vem sendo reconhecidas como biomarcadores de contaminação aquática e incluem: expressão de proteínas de defesa e detoxificação celular, atividade de enzimas de biotransformação, expressão de proteínas de estresse, peroxidação lipídica, dano ao DNA, alterações na função celular, alterações histológicas, resposta imune, etc. (Amiard-Triquet *et al.*, 2016).

O fenótipo de resistência à multixenobióticos (MXR) é um mecanismo de defesa celular amplamente reconhecido como biomarcador de contaminação aquática (Bard 2000; Achard *et al.*, 2004; Szakács *et al.*, 2008; Kurelec, 1992;

Kurelec, 1995; Kurelec *et al.*, 2000). Nesse contexto, a base molecular desse mecanismo é modulada pela ação das proteínas transportadoras da família ABC (ATP Binding Cassette), as quais estão localizadas nas membranas celulares de todos os organismos, e podem ser classificadas em dois tipos: 1) proteínas ABC de efluxo, representam um exemplo de biomarcadores que dificultam a entrada e o acúmulo de xenobióticos nas células, agindo como primeira linha de defesa, e também expulsando metabólitos tóxicos, atuando na última defesa; e 2) proteínas ABC de influxo, que exercem a função de importação de nutrientes críticos, como aminoácidos e açúcares (Epel *et al.*, 2008; Abbott, 2017). Nesse sentido, esses transportadores compõem uma grande família de proteínas que exercem as funções de importação e exportação de diferentes tipos de substratos para dentro e fora das células, onde essa translocação ocorre a partir de uma fonte de energia que é proveniente da hidrólise do ATP (To *et al.*, 2020; Wilkens, 2015).

De forma geral, esses transportadores ABC são organizados estruturalmente em quatro domínios (unidades funcionais): dois domínios TMDs (domínios transmembrana) (TMD1 e TMD2) que reconhecem e auxiliam o transporte do substrato, e dois domínios NBDs (domínios de ligação de nucleotídeos) (NBD1 e NBD2) que realizam a ligação com o ATP para gerar a energia da importação ou exportação desse substrato (To *et al.*, 2020; Holland, 2011; Wilkens, 2015). Para isso, o substrato se liga à cavidade dos domínios TMDs, induzindo uma mudança conformacional temporária dos domínios NBDs. Em seguida, ocorre a ligação do ATP aos domínios NBDs, o que reduz a afinidade de ligação do substrato pela cavidade dos TMDs e promove uma nova mudança conformacional nestes domínios. Assim, o substrato é liberado para dentro ou fora da célula, ao mesmo tempo em que ocorre a hidrólise do ATP, resultando na liberação de ADP e Pi. Por fim, o transportador retorna ao seu estado conformacional padrão, caracterizando o término do mecanismo dos transportadores ABC (Figura 1) (Oldham *et al.*, 2008; Holland, 2011; Litman *et al.*, 2001; Pohl, 2012; Krewulak e Vogel, 2008; Linton, 2007).

Figura 1 - Esquema representativo do funcionamento do mecanismo das proteínas transportadoras ABC.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025. Legenda: Domínios TMDs e NBDs, das proteínas transportadoras ABC de efluxo, sofrendo mudanças conformacionais para realizar o transporte do substrato para fora da célula.

Além disso, é importante ressaltar que o Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos (MXR) é modulado por essas proteínas transportadoras de efluxo ABC, as quais são capazes de promover o bombeamento de substratos exógenos e, também, endógenos (do próprio metabolismo) para fora das células dos organismos, que as possuem. E, assim, esse mecanismo (MXR) garante que as células possuam um tipo de defesa ao controlar a acumulação e o grau de toxicidade desses contaminantes (Lopes *et al.*, 2021; Bard, 2000; Szakács *et al.*, 2008). Nesse contexto, duas subfamílias de transportadores ABC estão envolvidas com o mecanismo MXR: a ABCB e a ABCC (Lopes, 2019).

A subfamília ABCB é representada pela glicoproteína-P (glicoproteína de permeabilidade ou P-gp), esta que transporta uma molécula por vez, seguindo um mecanismo de efluxo unidirecional para fora das células, após uma mudança conformacional temporária em sua estrutura (Safhi *et al.*, 2017; Litman *et al.*, 2001). Além de ser uma das proteínas transportadoras de efluxo ABC que não precisa do metabolismo do xenobiótico para atuar, confere o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) e é inespecífica, o que lhe permite acompanhar a evolução das novas moléculas biológicas e gerar proteção contra novos produtos químicos antropogênicos (Epel *et al.*, 2008). Contudo, esse extenso reconhecimento dos substratos pode levar à competição no sítio de ligação e, como consequência, agentes malignos que seriam expulsos, acabam acumulando no interior da célula (Epel *et al.*, 2008; Higgins, 2007).

Em relação à subfamília ABCC, compreende-se um segundo tipo de mecanismo conhecido como MRP (Proteína de Resistência à Múltiplas Drogas), este realiza o efluxo de diferentes drogas não metabolizadas e, também, metabolizadas dentro da célula do organismo, além de expulsar substâncias endógenas provenientes do próprio metabolismo do animal (Deeley *et al.*, 2006; Epel *et al.*, 2008).

Por essa razão, no ambiente natural diversos organismos expressam o fenótipo MXR, porém essa defesa pode ser limitada por alguns fatores, como: uma elevada concentração de xenobióticos, que irá gerar competição e permitir que alguns substratos tóxicos se acumulem nas células; a estrutura molecular do substrato, que promove o não reconhecimento de algumas moléculas pelas proteínas transportadoras, e estas acabam entrando e se acumulando nas células; e a quimiossensibilização, quando ocorre a inibição da ação dos transportadores devido alguns produtos químicos, e como consequência há um aumento na concentração de tóxicos dentro das células (Szakács *et al.*, 2006; Epel *et al.*, 2008).

Em relação à ação antrópica, os produtos químicos de origem humana também interferem neste mecanismo. Estes produtos, geralmente, apresentam uma estrutura molecular diferente, a qual pode não ser reconhecida pelas proteínas transportadoras de efluxo e entrar livremente nas células, causando efeitos nocivos aos organismos (Epel *et al.*, 2008). Além disso, quando há uma mistura de xenobióticos, as regiões de ligação dos transportadores podem saturar, apresentar competição ou serem inibidas diretamente, e, isso, influenciar no mecanismo de expulsão dos produtos químicos (Epel *et al.*, 2008; Higgins, 2007).

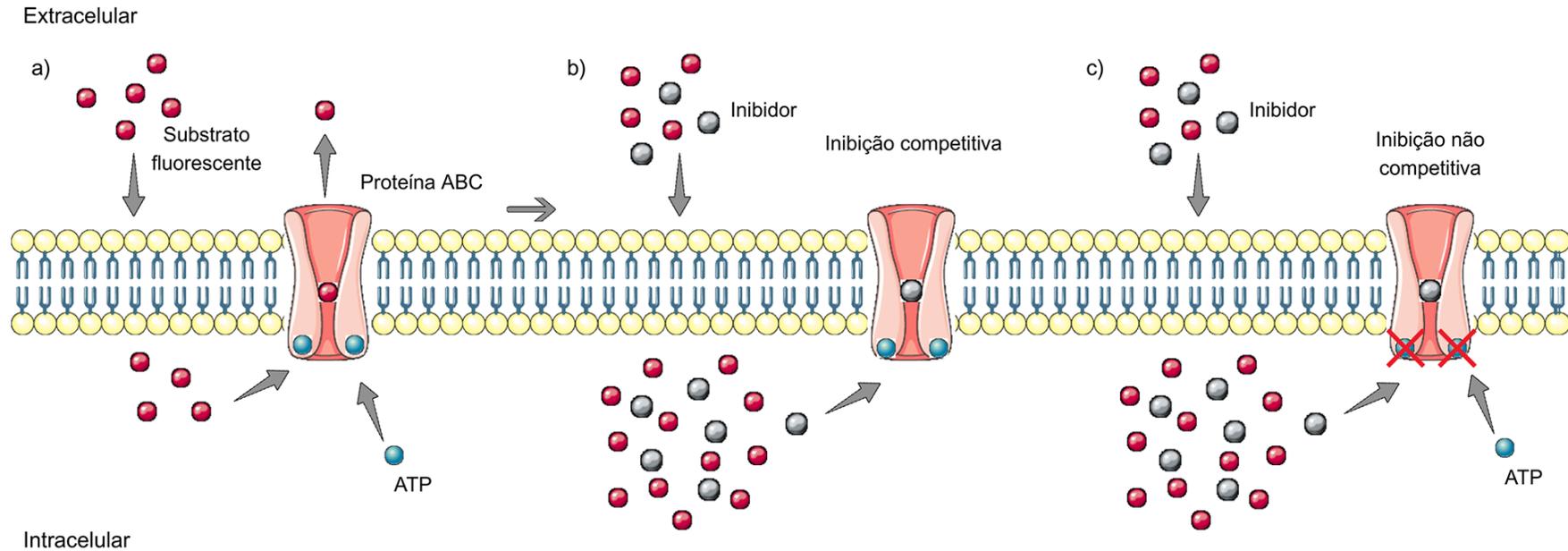
Dessa maneira, fica evidente a importância que o mecanismo MXR tem para uma grande diversidade de organismos que habitam em áreas poluídas, já que ele permite a existência e reprodução destas espécies ao mesmo tempo que garante

uma resistência ao estresse poluidor (Kurelec, 1992). Contudo, os diferentes substratos e suas concentrações podem interferir na ação desses transportadores de efluxo, onde essa interação ao longo do tempo demonstra uma adaptação à história evolutiva das espécies (Hamdoun e Epel, 2007).

Um método amplamente utilizado para identificar a atividade MXR é o ensaio do acúmulo de rodamina-B. Onde a rodamina-B, um corante fluorescente considerado um substrato da P-gp e MRP, entra no interior da célula e pode ser lançada para fora pela ação das bombas de efluxo localizadas na membrana celular, evitando seu acúmulo interno (Figura 2). Assim, esse método consiste na associação da rodamina-B com um inibidor, este que é capaz de promover o acúmulo dos substratos fluorescentes do corante dentro das células por inibir a ação das bombas de efluxo, onde a partir da medição da fluorescência emitida pela rodamina-B, agora, acumulada em células ou tecidos, será possível agir como um indicador indireto, mas confiável, da atividade do transportador, podendo revelar alterações na capacidade de efluxo em resposta a estressores ambientais ou exposição a agentes químicos (ver Figura 2). Dada sua sensibilidade e aplicabilidade em diversos táxons, o ensaio de acúmulo de rodamina-B tornou-se uma ferramenta útil em estudos ecotoxicológicos que investigam a modulação dos mecanismos de defesa celular (Kurelec, 1995; Kurelec *et al.*, 2000; Lopes, 2019).

Ainda nessa linha, é comum utilizar os inibidores das bombas de efluxo para as proteínas ABC, pois eles conseguem inibir a atividade MXR, promovendo um acúmulo de rodamina-B no interior da célula, e, assim, identificar a expressão desse fenótipo em determinados tecidos (Anjos *et al.*, 2017). Muitos artigos demonstraram o acúmulo da rodamina-B na presença de inibidores, indicando que este é um dos métodos ideais para identificar qual bomba de efluxo está envolvida no fenótipo MXR (Anjos *et al.*, 2017; Lopes, 2019; Jeong *et al.*, 2014; Bard, 2000; Campos *et al.*, 2014). Nesse contexto, cabe destacar dois inibidores modelos que serão utilizados, na atual pesquisa, para a identificação da expressão do fenótipo MXR: o cloridrato de verapamil (específico para a P-gp) e o MK571 (característico para a MRP) (Lopes, 2019; Lüders *et al.*, 2009). Esses inibidores podem ser classificados em competitivos e não competitivos (Figura 2). Em relação aos inibidores competitivos, exemplificados pelo cloridrato de verapamil, atuam bloqueando a ligação do substrato ao sítio ativo da proteína, o que impede o transporte de xenobióticos para fora da célula, isso é explicado devido à alta afinidade dos inibidores pela P-gp. Já os inibidores não competitivos, como o MK571, agem impedindo que ocorra a atividade da ATPase, está que é essencial para haver o transporte de efluxo de substratos (Stein, 1997; Barnes *et al.*, 1996; Lopes, 2019).

Figura 2 - Representação esquemática do funcionamento do ensaio do acúmulo de rodamina-B.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025. Legenda: a) Representa como ocorre a interação entre a rodamina-B e a proteína ABC sem a ação dos inibidores, onde a rodamina-B tende a ser bombeada para fora da célula e evitar seu acúmulo interno; b) Ilustra a inibição competitiva, onde o inibidor compete com a rodamina-B por ter uma maior afinidade pelo sítio ativo da proteína ABC, essa interação impede que a rodamina-B seja bombeada para fora da célula e permite seu acúmulo no interior, o qual será identificado pela emissão de fluorescência; c) Demonstra a inibição não competitiva, em que o inibidor bloqueia a atividade da ATPase e resulta no acúmulo da rodamina-B no interior da célula, a qual é percebida pela emissão de fluorescência.

Além dos inibidores modelo, as funções das proteínas do fenótipo MXR também podem ser influenciadas pela presença de alguns metais pesados, como por exemplo: cobre, cádmio, mercúrio, zinco e chumbo (Achard *et al.*, 2004; Rocha e Souza, 2012; Torre *et al.*, 2014; Amado, 2010). Nesse contexto, sabe-se que o cádmio, mesmo em concentrações mais baixas, é capaz de alterar a fisiologia dos organismos aquáticos interferindo diretamente na sobrevivência destes (Ivanina e Sokolova, 2008), e o cobre pode ser considerado um substrato para as proteínas transportadoras ABC visto que apresenta um fenótipo de resistência a múltiplos xenobióticos, além de ser encontrado em corpos d'água vindo dos esgotos domésticos e industriais (Anjos, 2017; Barbosa *et al.*, 2012; Wallner-Kersanach *et al.*, 2016). Foi mostrado em *Corbicula fluminea*, um bivalve de água doce, que a exposição ao cádmio pode aumentar a expressão da P-gp e, conseqüentemente, induzir o fenótipo MXR, e a exposição ao cobre pode resultar na alteração das funções das proteínas ABC (Achard *et al.*, 2004; Legeay *et al.*, 2005). Jeong *et al.* (2014) utilizou o copépode *Tigriopus japonicus* para demonstrar que o cobre pode atuar como um substrato para as proteínas ABC, visto que quando essas são inibidas, há um acúmulo maior do cobre no interior das células.

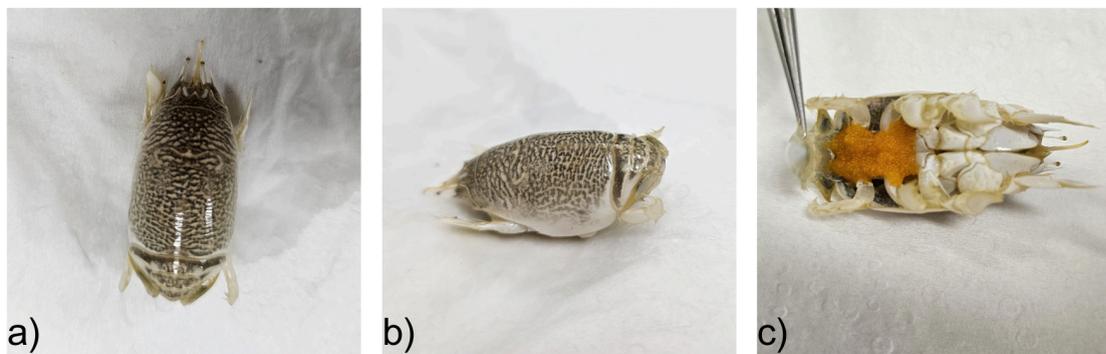
Por conseguinte, as últimas décadas vêm sendo marcadas pelo aumento da urbanização e de atividades sociais e econômicas, as quais têm promovido impactos e degradação de toda a zona costeira, incluindo os ecossistemas das praias arenosas (Davenport e Davenport, 2006; Defeo e McLachlan, 2005). Além disso, a descarga de efluentes é um exemplo de interferência humana que resulta em eventos de alto impacto sobre as espécies que compõem a macrofauna bentônica e as populações das praias arenosas, não só pela presença de poluentes, mas também porque os efluentes domésticos e pluviais podem alterar a salinidade no local do despejo, impondo um desafio osmótico para os organismos que habitam esse ecossistema (Defeo *et al.*, 2009; Jorge-Romero *et al.*, 2019; Memon *et al.*, 2021).

É preciso acentuar que, a salinidade é um fator ambiental capaz de controlar a distribuição das espécies e afetar os processos fisiológicos e comportamentais dos organismos, tanto nos ecossistemas marinhos, como nos estuários, além de alterar a composição das espécies e influenciar nas funções ecossistêmicas das praias arenosas, uma vez que a redução de salinidade pode induzir uma diminuição na produção de biomassa e na abundância de predadores (Lercari e Defeo, 1999; Davenport, 1979; Navarro, 1988; Lercari e Defeo, 2006; Attrill, 2002; Bergamino *et al.*, 2009; Jorge-Romero *et al.*, 2019; Fanini *et al.*, 2012; Laurino *et al.*, 2020). Além disso, há registros de diminuição da diversidade e abundância de invertebrados nas proximidades de uma descarga pluvial (Lercari e Defeo, 2003; Bergamino *et al.*, 2009; Jorge-Romero *et al.*, 2019). Segundo Anjos *et al.* (2016), as brânquias de *Mesodesma mactroides*, um molusco filtrador, apresentou um aumento do fenótipo MXR quando exposto em uma solução hiposmótica. Isto significa que os mecanismos de defesa dos organismos aquáticos podem ser ativados dependendo da salinidade, logo é importante verificar se a expressão do fenótipo MXR em *Emerita almeidai* também é afetada pela exposição a diferentes salinidades.

Em relação ao *Emerita almeidai*, este invertebrado é uma espécie críptica recentemente descrita por Mantelatto *et al.* (2023), a qual era anteriormente reconhecida de forma equivocada como *Emerita portoricensis* (Schmitt, 1935), devido suas semelhanças morfológicas. Além disso, *E. almeidai* (família: Hippidae) é uma espécie de crustáceo decápode representante da macrofauna bentônica das praias arenosas, sendo endêmica da costa brasileira, onde vivem enterrados na

zona entre marés (Mantelatto *et al.*, 2023). Nesse contexto, as espécies do gênero *Emerita* são caracterizadas por terem um tempo de vida curto, pelas fêmeas possuírem uma carapaça maior devido sua estratégia de reprodução, por serem adaptados ao ambiente das praias arenosas (como por exemplo a alimentação através de filtração das antênulas) e possuírem um tamanho médio de mais ou menos 26,48 mm (Eutrópio *et al.*, 2006; Defeo e Cardoso, 2004; Subramonian e Gunamalai, 2003). Ademais, esses crustáceos, popularmente conhecidos como Tatuís ou Tatuíras, são capazes de contribuir para as análises ecotoxicológicas, uma vez que apresentam sensibilidade pelas ações antrópicas e respostas fisiológicas quando em contato com produtos químicos, e por possuírem uma elevada taxa de plasticidade explicada pela sua história evolutiva (Lercari e Defeo, 1999; Spritzer *et al.*, 2015; Neto *et al.*, 2019; Dugan *et al.*, 1991; Dugan *et al.*, 1994; Contreras *et al.*, 1999).

Figura 3 - Registros fotográficos do *Emerita almeidai* utilizado na atual pesquisa.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025. Legenda: Vista dorsal (a), lateral (b) e ventral (c) da fêmea ovada do *Emerita almeidai*.

Além disso, a expressão do fenótipo MXR já foi amplamente estudada em diversos filos aquáticos, como os cnidários, moluscos, cordados e poríferos (Anjos *et al.*, 2019; Achard *et al.*, 2004; Smital e Sauerborn, 2002; Müller *et al.*, 1996), contudo quando se trata dos artrópodes (especificamente dos crustáceos) ainda existem poucos artigos abordando este tema, principalmente no âmbito do ecossistema das praias arenosas. Alguns trabalhos costumam utilizar um crustáceo conhecido como *Daphnia magna* para estudar bioensaios ecotoxicológicos, como o Mecanismo de Resistência a Multixenobióticos, porém esta é uma espécie que habita corpos de água, e não são encontrados nas praias arenosas (Campos *et al.*, 2014; Vehniäinen e Kukkonen, 2015; Georgantzopoulou *et al.*, 2016). Um outro estudo muito importante utilizou o *Emerita brasiliensis* (encontrados nas zonas entre-marés das praias arenosas) como bioindicador para avaliar os efeitos que as descargas de água doce provocam na fauna das praias arenosas, e concluíram que existem consequências na distribuição, abundância e no ciclo de vida (Lercari e Defeo, 1999; Machado *et al.*, 2018). Nesse contexto, pouco se sabe sobre a expressão desse fenótipo nos Tatuís (em especial *Emerita almeidai*), ficando claro a importância de estudar essa característica na espécie como uma possível ferramenta de biomonitoramento das praias arenosas. Além disso, as brânquias são bastante utilizadas para realizar os testes do fenótipo MXR em crustáceos, pelo fato de serem o primeiro contato com o meio aquático, podendo absorver diferentes tipos de

substratos, e por agirem como primeira linha de defesa no organismo (Anjos *et al.*, 2016). Assim, a atual pesquisa utilizou as brânquias do *Emerita almeidai* para avaliar sua expressão do fenótipo MXR.

Figura 4 - Amostras das brânquias do *Emerita almeidai* vistas ao microscópio.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025. Legenda: Brânquias do *Emerita almeidai*.

2 OBJETIVOS

Verificar o fenótipo MXR nas brânquias do crustáceo *Emerita almeidai*, bem como sua modulação por estressores ambientais, visando avaliar seu potencial como ferramenta de bioindicação em praias arenosas.

Objetivos específicos

- Avaliar, *in vivo* e *in vitro*, a atividade do fenótipo MXR por meio do ensaio de acúmulo de rodamina-B.
- Avaliar *in vitro* o efeito dos inibidores de proteínas ABC pelo método do acúmulo de rodamina-B nas brânquias.
- Testar *in vitro* a modulação do acúmulo de rodamina-B por metais como cobre e cádmio.
- Verificar *in vivo* o impacto da variação de salinidade, isoladamente e combinada a metais, na atividade do fenótipo MXR.

3 METODOLOGIA

3.1 Local de coleta

As coletas dos espécimes de *Emerita almeidai* foram realizadas em uma praia de Cabedelo e duas praias de João Pessoa - PB: Praia de Intermares, Praia de Manaíra e Praia de Cabo Branco, nas imediações de descargas de águas pluviais (Figura 5).

Figura 5 - Mapa dos pontos de coleta em duas praias de João Pessoa e uma de Cabedelo - PB.



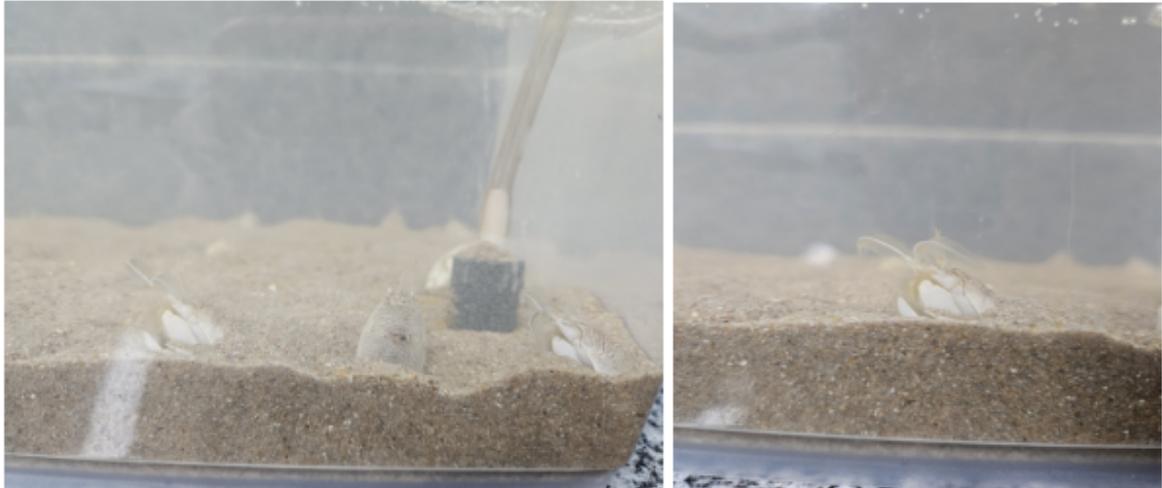
Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

3.2 Coleta e manutenção dos animais

Os indivíduos foram coletados manualmente durante a maré baixa e acondicionados em recipientes de plástico contendo areia e água do local de coleta, em seguida foram transferidos para o Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) localizado no Campus V da UEPB em João Pessoa - PB.

No laboratório, os animais foram mantidos em aquários de plástico contendo água do mar e areia do local de coleta, com aeração constante e fotoperíodo natural. Os animais eram alimentados diariamente com ração flocada para peixes. Durante o período de aclimação em laboratório foi possível observar os animais ativos e com as antenas expostas (Figura 6).

Figura 6 - Registro fotográfico do período de aclimação do *E. almeidai* em laboratório.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

3.3 Ensaio *in vitro* do efeito da inibição de bombas de efluxo relacionadas ao fenótipo MXR

Para a caracterização *in vitro* da expressão do fenótipo MXR em *Emerita almeidai* o ensaio de acúmulo de rodamina-B na presença de inibidores de proteínas ABC foi realizado, uma vez que o aumento do acúmulo de rodamina-B dentro das células na presença de um inibidor de bomba de efluxo indica o envolvimento do transportador com o fenótipo MXR (Lopes, 2019). Para tanto, indivíduos aclimatados por ao menos 4 dias foram crioanestesiados e tiveram suas brânquias removidas com auxílio de tesoura e pinça de aço inoxidável. Assim que removidas as brânquias eram distribuídas em eppendorfs previamente pesados contendo: PBS (solução salina para invertebrados marinhos) (grupo autofluorescência); PBS + rodamina-B 1 μM (grupo R); PBS + rodamina-B 1 μM + cloridrato de verapamil 20 μM (grupo R + VE); ou PBS + rodamina-B 1 μM + MK571 20 μM (grupo R + MK) (ver Figura 7). Em seguida, os eppendorfs foram protegidos da luz e a exposição às condições experimentais durou uma hora.

Após 1 hora, os eppendorfs foram centrifugados durante 1 minuto (Biopet, mini centrífuga de bancada), houve o descarte do sobrenadante e as brânquias passaram por um processo de lavagem com PBS. Esses eppendorfs foram centrifugados por mais 1 minuto, onde o PBS foi descartado e substituído por 500 μl de água destilada, em seguida as amostras foram congeladas por no mínimo 2 horas. Posteriormente os tecidos foram então homogeneizados com um homogeneizador de tecidos (Homomix, D-500 Ultra). Essa etapa consiste em liberar o conteúdo de rodamina-B acumulado dentro das células branquiais.

Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas em 4.000 rpm por 5 minutos (Eppendorf, 5804R). O sobrenadante foi pipetado, onde 100 μl das amostras foram distribuídas, em triplicatas, em poços individuais da microplaca preta de 96 poços que foi levada para uma leitora de placas (EspectraMax I3, Molecular Devices) e a fluorescência emitida pela rodamina-B acumulada no tecido foi lida em 544 nm de excitação e 590 nm de emissão. Esse protocolo foi repetido até totalizar um número amostral de no mínimo 6 indivíduos.

Os valores de fluorescência são obtidos na leitora como unidades relativas de fluorescência (URF). A partir dos valores brutos de URF foi calculada a média das triplicatas e em seguida o valor médio foi dividido por 1000. Essa correção foi realizada, em todas as condições experimentais, para melhorar a apresentação dos valores. Uma vez que os valores de fluorescência obtidos indicam o acúmulo de rodamina-B no tecido, foi necessário normalizar os valores obtidos pela quantidade de tecido amostrada. Essa normalização foi realizada ou pelo peso úmido do tecido (mg), ou pela quantidade de proteínas totais presentes no homogeneizado ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). O peso úmido foi obtido pesando os eppendorfs antes e depois de receberem as brânquias. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976).

3.4 Ensaio *in vitro* do efeito de metais sobre o acúmulo de rodamina-B

Para a avaliação *in vitro* da expressão do fenótipo MXR sob a influência dos metais, os indivíduos de *Emerita almeidai*, após aclimação por no mínimo quatro dias, foram crioplanados. Em seguida, foram usados tesoura e pinça de aço inoxidável para remoção das brânquias, onde estas foram distribuídas em eppendorfs previamente pesados contendo: PBS + rodamina-B $1\ \mu\text{M}$ (grupo R); PBS + rodamina-B $1\ \mu\text{M}$ + metal $10\ \mu\text{M}$ (grupo R + Cd/Cu 10); ou PBS + rodamina-B $1\ \mu\text{M}$ + metal $100\ \mu\text{M}$ (grupo R + Cd/Cu 100) (ver Figura 7). A partir deste ponto, seguiu-se conforme descrito na seção anterior.

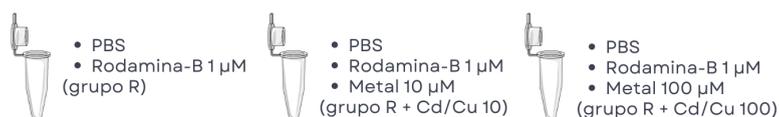
Em outro momento, foi realizado um teste *in vitro* para analisar os efeitos do cobre na presença do inibidor cloridrato de verapamil. Para esse ensaio, as brânquias, após removidas como explicado na seção anterior, foram distribuídas em eppendorfs previamente pesados contendo: PBS + rodamina-B $1\ \mu\text{M}$ (grupo R); PBS + rodamina-B $1\ \mu\text{M}$ + cloridrato de verapamil $20\ \mu\text{M}$ (grupo R + V); PBS + rodamina-B $1\ \mu\text{M}$ + cobre $100\ \mu\text{M}$ (grupo R + Cu); ou PBS + rodamina-B $1\ \mu\text{M}$ + cloridrato de verapamil $20\ \mu\text{M}$ + cobre $100\ \mu\text{M}$ (grupo R + Cu + V) (ver Figura 7). Deste ponto em diante, os procedimentos seguiram conforme especificado na seção anterior.

Figura 7 - Desenho experimental das metodologias *in vitro* utilizadas nesta pesquisa.

a) Efeito dos inibidores sobre o acúmulo de rodamina-B



b) Efeito dos metais pesados sobre o acúmulo de rodamina-B



c) Efeito da interação entre metal pesado e inibidor sobre o acúmulo de rodamina-B



Fonte: Elaborada pela autora, 2025. Legenda: Esta figura mostra um esquema do protocolo e das concentrações utilizadas para realizar as metodologias *in vitro* (a, b e c, dos tópicos 3.3 e 3.4 respectivamente).

3.5 Ensaios *in vivo* do efeito de metais isoladamente ou combinados com variação de salinidade

Nessa etapa, para a verificação *in vivo* da expressão do fenótipo MXR, os indivíduos de *Emerita almeidai* foram submetidos ao ensaio de acúmulo de rodamina-B e tiveram suas brânquias removidas após o ensaio. Os espécimes aclimatados por no mínimo 4 dias foram previamente expostos por 24 horas à salinidade padrão do ambiente marinho 35‰ e à salinidade reduzida 20‰. A exposição ocorreu em aquários contendo 500 mL de água reconstituída (água destilada + sal marinho Ocean Tech, ajustado à salinidade experimental) e 500 g de areia provenientes do local de coleta. Após esse regime de pré-exposição, a rodamina-B na concentração de 2,5 µM foi adicionada à água (ver Figura 8), o aquário foi protegido da incidência de luz, e o ensaio de acúmulo de rodamina-B seguiu-se por 2 horas. Após o ensaio, os animais foram crionestesiados e tiveram suas brânquias removidas. As brânquias removidas foram acondicionadas em microtubos previamente pesados contendo 500 µl de água deionizada. A homogeneização do tecido, distribuição do sobrenadante na microplaca e leitura de fluorescência ocorreu conforme descrito anteriormente.

Além do efeito da exposição dos animais à variação de salinidade, nessa etapa também verificamos o efeito da salinidade combinada ao metal. Para isso, o mesmo procedimento acima foi realizado, porém no período de pré-exposição foi acrescentado à água do aquário Cádmio ou Cobre na concentração de 1000 µg/L (ver Figura 9). Todo o processo seguiu-se como descrito anteriormente.

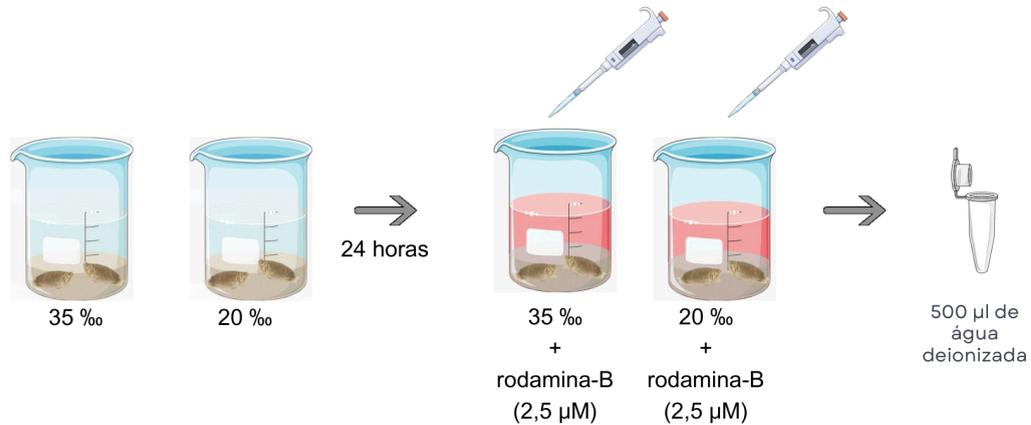
Figura 8 - Registro fotográfico do *Emerita almeidai* durante a exposição aos metais em salinidade reduzida.



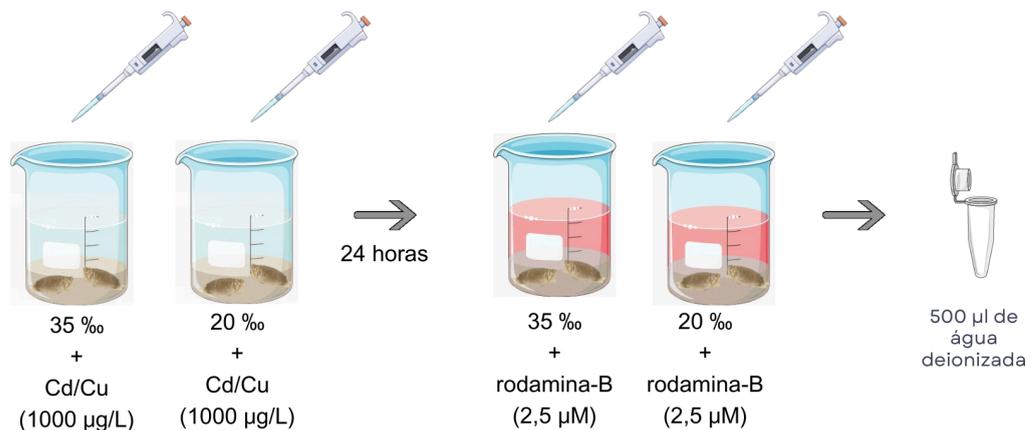
Fonte: Elaborada pela autora, 2025.

Figura 9 - Desenho experimental das metodologias *in vivo* utilizadas nesta pesquisa.

a) Efeito da salinidade isolada sobre o acúmulo de rodamina-B



b) Efeito da salinidade combinada aos metais pesados sobre o acúmulo de rodamina-B



Fonte: Elaborada pela autora, 2025. Legenda: a) representa a metodologia do efeito da salinidade isolada e b) mostra o procedimento para a metodologia do efeito da salinidade combinada à metais pesados.

3.6 Análise estatística

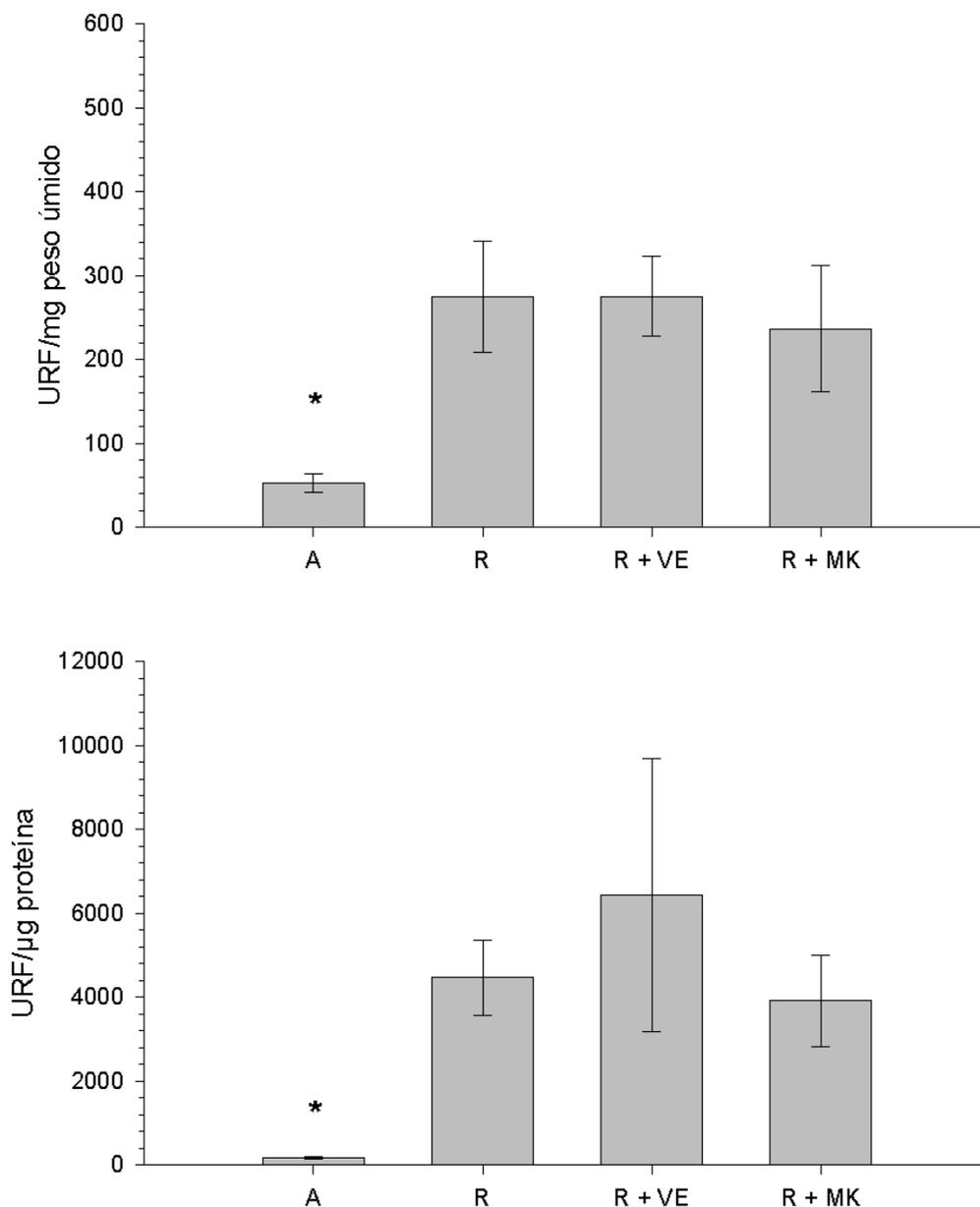
Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. As análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizadas pelo software SigmaPlot 12.0. A normalidade e a homocedasticidade foram testadas automaticamente pelo software e quando tais pressupostos foram atendidos, nos ensaios *in vitro*, as comparações entre dois grupos foram realizadas utilizando o teste t de Student, enquanto comparações entre três ou mais grupos foram feitas por meio de análise de variância de um fator (One Way ANOVA). Para dados que não apresentaram distribuição normal ou homogeneidade, foram aplicados os testes não paramétricos de Mann-Whitney (dois grupos) ou Kruskal-Wallis (três ou mais grupos). Quando avaliados os efeitos combinados da salinidade e da exposição ao metal nos ensaios *in vivo*, uma vez que os dados apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas, utilizou-se a ANOVA de dois fatores (Two-Way ANOVA) seguido de Holm-Sidak method como pós teste. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Efeitos dos inibidores no acúmulo de rodamina-B

Não houve diferença estatística no acúmulo de rodamina-B nas brânquias de *E. almeidai* quando os inibidores cloridrato de verapamil e MK571 foram empregados no ensaio *in vitro* de acúmulo de rodamina-B (ANOVA, $p = 0,886$). No entanto, a diferença significativa foi identificada entre a autofluorescência do tecido (ou seja, na ausência de rodamina-B) e a fluorescência emitida pelas brânquias submetidas à rodamina-B durante o ensaio *in vitro* (Mann-Whitney, $p < 0,05$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Gráfico do efeito dos inibidores no ensaio de acúmulo de rodamina-B nas brânquias do *E. almeidai*.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025. Legenda: Autofluorescência (A) e fluorescência emitida pelo acúmulo de rodamina-B nas brânquias de *E. almeidai* na ausência (R) ou na presença dos inibidores: cloridrato de verapamil 20 μM (R + VE) ou MK571 20 μM (R + MK). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão. (* indica diferença estatística entre o os grupos A e R, Mann-Whitney $p < 0.05$, $n = 6$).

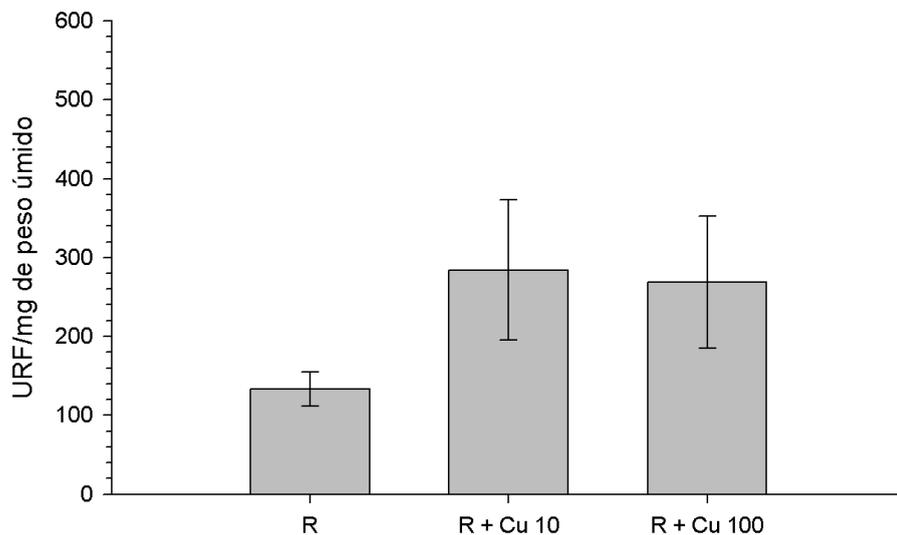
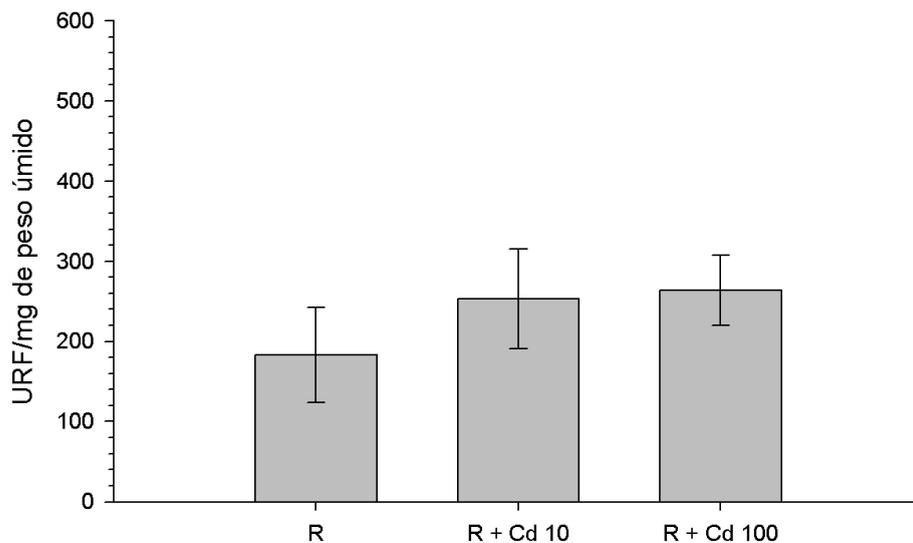
Os dados obtidos demonstram que o acúmulo de rodamina-B nas brânquias de *Emerita almeidai* foram consistentes, independentemente do método de normalização adotado. Dessa forma, nos próximos ensaios seguiu-se apenas com o método de normalização pelo peso úmido, uma vez que este representa uma opção mais rápida e economicamente viável. O aumento significativo de fluorescência nas brânquias expostas à rodamina-B, quando comparados ao controle (autofluorescência), indica que o fluorescente acessa as células branquiais acumulando no interior das mesmas. No entanto, a presença dos inibidores cloridrato de verapamil e MK571, frequentemente utilizados para bloquear proteínas de efluxo da família ABC, não alteraram significativamente os níveis de acúmulo de rodamina-B nas brânquias. Esse resultado sugere duas possíveis explicações para esta espécie: 1) os transportadores usualmente sensíveis a esses inibidores não desempenham papel relevante na modulação do efluxo de rodamina-B sob as condições experimentais aplicadas; 2) a ausência desse efeito pode indicar uma baixa expressão desses transportadores.

Em diversas espécies, a rodamina-B é um substrato clássico de proteínas de efluxo, sendo seu acúmulo frequentemente aumentado pela aplicação de inibidores como cloridrato de verapamil, que bloqueia P-glicoproteínas, e MK571, inibidor de MRPs. De acordo com os resultados de Georgantzopoulou *et al.* (2016), esses inibidores modelos foram capazes de confirmar que a espécie de crustáceo *Daphnia magna* possui o fenótipo MXR e, conseqüentemente, que as proteínas que atuam nesse mecanismo são a P-gp e a MRP. Um outro estudo identificou o fenótipo MXR em três espécies de sanguessugas que habitam um riacho próximo a uma estação de tratamento de efluentes, cada uma apresentando um nível específico de fluorescência, determinado por meio do ensaio de acúmulo de rodamina-B, com o cloridrato de verapamil sendo utilizado como inibidor (Assef *et al.*, 2014). Contudo, nem sempre esses inibidores vão ter os efeitos esperados. Vehniäinen e Kukkonen (2015), também utilizaram a *Daphnia magna* em seus testes e tanto o cloridrato de verapamil, quanto o MK571, não afetaram o acúmulo de rodamina-B no tecido. Porém, quando utilizaram a reversina 205, um outro inibidor para as proteínas ABC, houve um aumento da fluorescência, indicando que ocorreu a inibição dos transportadores e a rodamina-B ficou acumulada no interior do tecido. Nesse contexto, seria adequado investigar, futuramente, se a reversina 205 poderia ser um bom inibidor para as proteínas ABC do *Emerita almeidai*, já que o cloridrato de verapamil e MK571 não afetaram o acúmulo de rodamina-B nas brânquias. Um outro estudo identificou o fenótipo MXR dos copépodes (*Tigriopus japonicus*), onde as proteínas ABC foram inibidas pelo uso dos inibidores (cloridrato de verapamil e zosuquidar), resultando em um aumento significativo da fluorescência de rodamina-B acumulada (Jeong *et al.*, 2014). Além disso, cabe destacar que, mesmo não havendo a inibição da expressão do fenótipo MXR, não significa que o organismo não apresenta mecanismos de efluxo (Vehniäinen e Kukkonen, 2015; Lopes *et al.*, 2021).

4.2 Efeito de metais no acúmulo de rodamina-B

A co-exposição das brânquias de *E. almeidai* à rodamina-B e aos metais cádmio e cobre durante o ensaio *in vitro* não resultou em diferenças estatisticamente significativas nos níveis de fluorescência emitida (Cd ANOVA $p = 0,551$, Cu Kruskal-Wallis $p = 0,576$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Gráfico do efeito dos metais no ensaio de acúmulo de rodamina-B nas brânquias do *E. almeidai*.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025. Legenda: Fluorescência emitida pelo acúmulo de rodamina-B na brânquia de *E. almeidai* isolada (R) ou em co-exposição com Cádmio 10 μM (R + Cd 10), Cádmio 100 μM (R + Cd 100), Cobre 10 μM (R + Cu 10) ou Cobre 100 μM (R + Cu 100). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão ($n = 6-12$).

Esse resultado indica que, nas condições experimentais adotadas, a presença desses metais não afetou substancialmente o acúmulo de rodamina-B, sugerindo

que as bombas de efluxo nas brânquias não foram modulados pelos metais. No entanto, no ensaio do cobre há uma tendência de acúmulo, o que pode indicar que o tamanho amostral pode não ter sido suficiente para detectar o efeito desse metal em particular.

A literatura aponta que os metais podem interferir na atividade das proteínas de efluxo, seja por inibição direta, ou por aumentar a expressão dessas proteínas. De acordo com Achard *et al.* (2004) e Legeay *et al.* (2005), a exposição ao cádmio pode aumentar a expressão da P-gp e, conseqüentemente, induzir o fenótipo MXR em *Corbicula fluminea*, um bivalve de água doce. Em relação ao cobre, Jeong *et al.* (2014) demonstraram que este metal pode atuar como um substrato para as proteínas ABC do copépode *Tigriopus japonicus*, uma vez que as proteínas transportadoras ABC foram inibidas e houve o acúmulo do cobre no interior do tecido. No caso do nosso ensaio, o tempo experimental não seria suficiente para promover um aumento de expressão de modo que nosso objetivo aqui seria testar a interação do metal com as proteínas de efluxo já existentes.

Os resultados de Timofeyev *et al.* (2007) mostraram que a exposição ao cádmio ocasionou em uma elevada inibição das proteínas transportadoras ABC em anfípodas de água doce, e conseqüentemente em um maior acúmulo de rodamina-B. Um outro estudo apontou que, quando duas espécies de Collembola (*F. candida* e *Cyphoderus* sp.) foram expostas a solos contaminados com metais pesados, o acúmulo de rodamina-B foi evidenciado, indicando uma inibição dos transportadores ABC pelos metais, e o oposto ocorreu quando foram expostas em solos não contaminados por metais pesados (Lopes *et al.*, 2024). Bielen *et al.* (2014) também comprovou que as exposições dos tecidos de lagostins ao mercúrio e ao zinco foram capazes de causar a inibição da atividade MXR e, assim, promover um aumento significativo na fluorescência da rodamina-B.

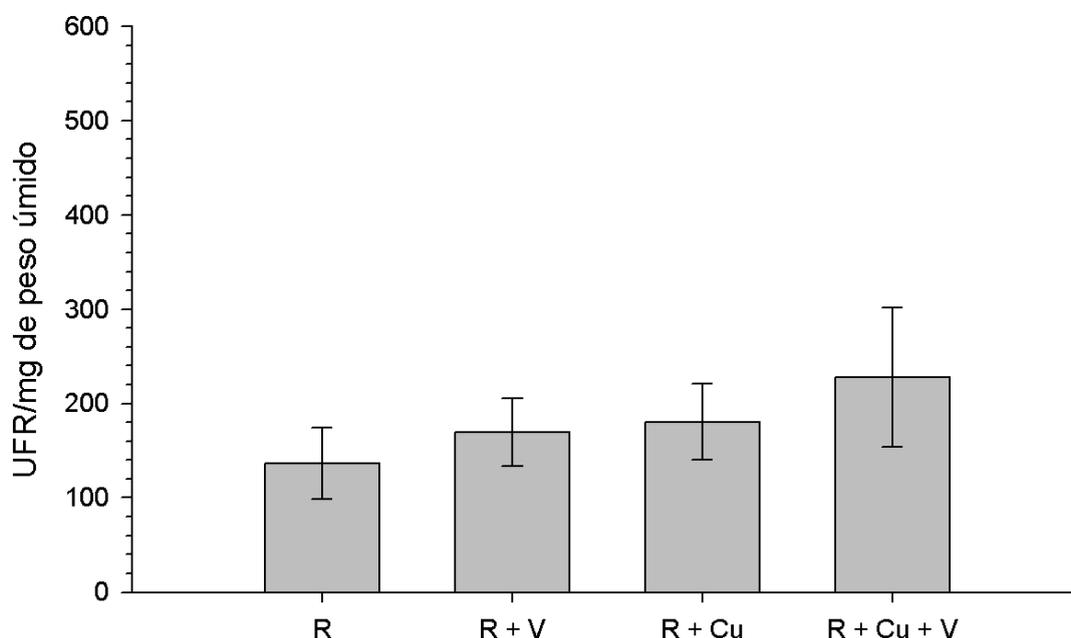
Contudo, existem dados que demonstram que a exposição a metais pesados pode induzir a expressão do fenótipo MXR em diferentes taxa e ocasionar uma diminuição do acúmulo da rodamina-B (Ivanina e Sokolova, 2008; Campos *et al.*, 2014; Achard *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2013), ou, simplesmente, não influenciarem no fenótipo MXR, assim como o estudo atual (Anjos *et al.*, 2017). Partindo do princípio de que as proteínas de efluxo ABC podem responder de diferentes formas à diferentes situações quando expostas a metais pesados (devido aos diversos tipos de metodologias utilizadas nesses diferentes trabalhos), é indicado que sejam realizados mais estudos para entender como ocorre a relação entre os metais e a expressão do fenótipo MXR (Lopes *et al.*, 2024).

4.3 Efeito da interação entre metal e inibidor

Não foram observadas diferenças significativas na fluorescência emitida pela rodamina-B entre os diferentes tratamentos testados nesta etapa (Kruskal-Wallis, $p = 0,325$) (Gráfico 3).

Vale ressaltar que nesta etapa o MK571 — outro inibidor frequentemente empregado para bloquear proteínas de efluxo, particularmente do tipo MRP — não foi utilizado por restrições associadas ao custo elevado do reagente e à sua disponibilidade limitada no laboratório. Também vale ressaltar que apenas o cobre foi testado, por ter apresentado os resultados mais promissores na etapa anterior.

Gráfico 3 - Gráfico do efeito da interação entre o metal e o inibidor nas brânquias do *E. almeidai*.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025. Legenda: Fluorescência emitida pelo acúmulo de rodamina-B na brânquia de *E. almeidai* isolada (R), na presença do inibidor cloridrato de verapamil 20 μ M (R + V), na presença de Cobre 100 μ M (R + Cu) e na associação de Cobre 100 μ M com cloridrato de verapamil 20 μ M (R + Cu + V). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão (n = 11).

Os resultados seguem consistentes com as etapas anteriores e indicam que não houve interação dos metais e inibidores com as bombas de efluxo. Porém, na literatura, a análise da atividade MXR de *Bunodosoma cangicum*, uma espécie de anêmona-do-mar, na presença de cloridrato de verapamil e diferentes concentração de cobre, evidenciou uma inibição do fenótipo MXR em todas as concentrações do metal, onde nas concentrações mais baixas do cobre o cloridrato de verapamil promoveu um acúmulo de rodamina-B 2 vezes maior, e em concentrações mais altas do cobre o cloridrato de verapamil influenciou em um aumento de 6 vezes no acúmulo da rodamina-B (Anjos *et al.*, 2017). Os resultados de Jeong *et al.* (2014) mostraram que, os metais utilizados juntamente com os inibidores na análise com os copépodes, foram capazes de inibir as proteínas ABC e promover tanto uma alta fluorescência da rodamina-B acumulada, quanto um acúmulo do metal no tecido. Para Ivanina e Sokolova (2008), as brânquias e hepatopâncreas da espécie de ostra *Crassostrea virginica* quando expostas ao metal (cádmio) e aos inibidores, apresentaram um aumento de 2 a 2,5 vezes na expressão da P-glicoproteína.

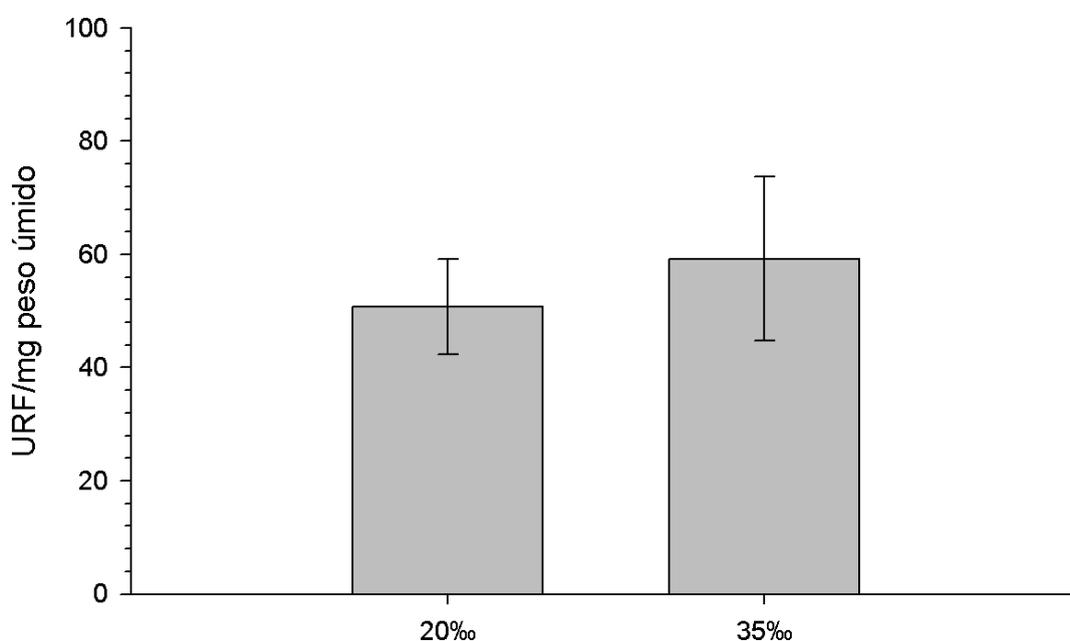
É importante destacar que todos os ensaios *in vitro* realizados foram independentes, com grupos controle (R) próprios. Ainda assim, observou-se notável consistência nos resultados: a faixa de valores de emissão de fluorescência foi semelhante entre os ensaios, e tratamentos equivalentes apresentaram respostas compatíveis. De modo geral, os resultados dos ensaios *in vitro* sinalizam a necessidade de estudos futuros, empregando outros inibidores e talvez outros metais, em diferentes concentrações para aprofundar a compreensão sobre o

envolvimento de proteínas de efluxo e a resistência a multixenobióticos em *E. almeidai*.

4.4 Efeito da redução de salinidade no ensaio de acúmulo de rodamina-B

Quando espécimes de *E. almeidai* foram submetidos ao ensaio de acúmulo de rodamina-B após passarem por 24 horas de exposição à salinidade padrão do ambiente marinho (35‰) e à salinidade reduzida (20‰), observou-se que não houve diferença significativa na fluorescência emitida pelo acúmulo de rodamina-B no tecido branquial (Mann-Whitney $p = 0,751$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Gráfico do efeito da redução de salinidade no ensaio de acúmulo da rodamina-B nas brânquias do *E. almeidai*.



Fonte: Elaborada pela autora, 2025. Legenda: Fluorescência emitida pelo acúmulo de rodamina-B nas brânquias de espécimes de *E. almeidai* submetidos ao ensaio de acúmulo de rodamina-B após 24 horas de exposição à salinidade 35‰ e à salinidade reduzida 20‰. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão ($n = 12$).

Esse resultado indica que uma redução de salinidade não interferiu na dinâmica do acúmulo de rodamina-B e provavelmente não afetou a integridade da barreira do epitélio branquial.

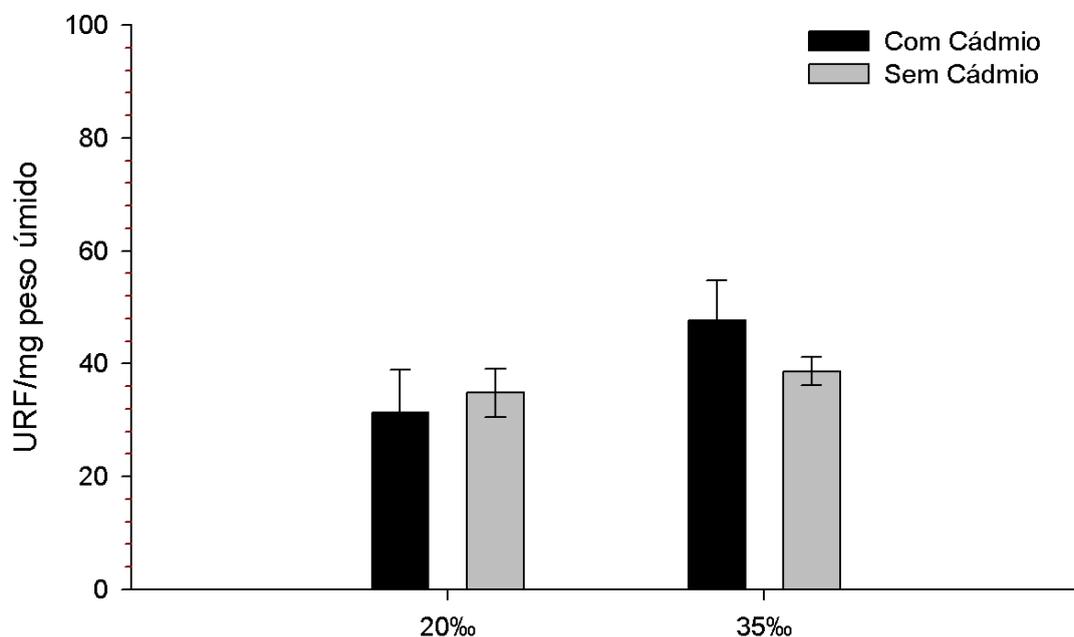
A escolha de testar salinidade reduzida nessa etapa se fundamenta na problemática das descargas de águas pluviais em praias arenosas, muitas vezes contaminadas com esgoto doméstico, que resultam em episódios agudos de redução de salinidade e configuram um estressor osmótico relevante para a fauna de praias arenosas (Lercari e Defeo, 1999; Lercari e Defeo, 2006; Attrill, 2002). Segundo Anjos *et al.* (2019), seus resultados demonstraram que as diferentes salinidades testadas em *Bunodosoma cangicum*, espécie de anêmona do mar, não foram suficientes para haver diferença significativa, e não foram capazes de interferir

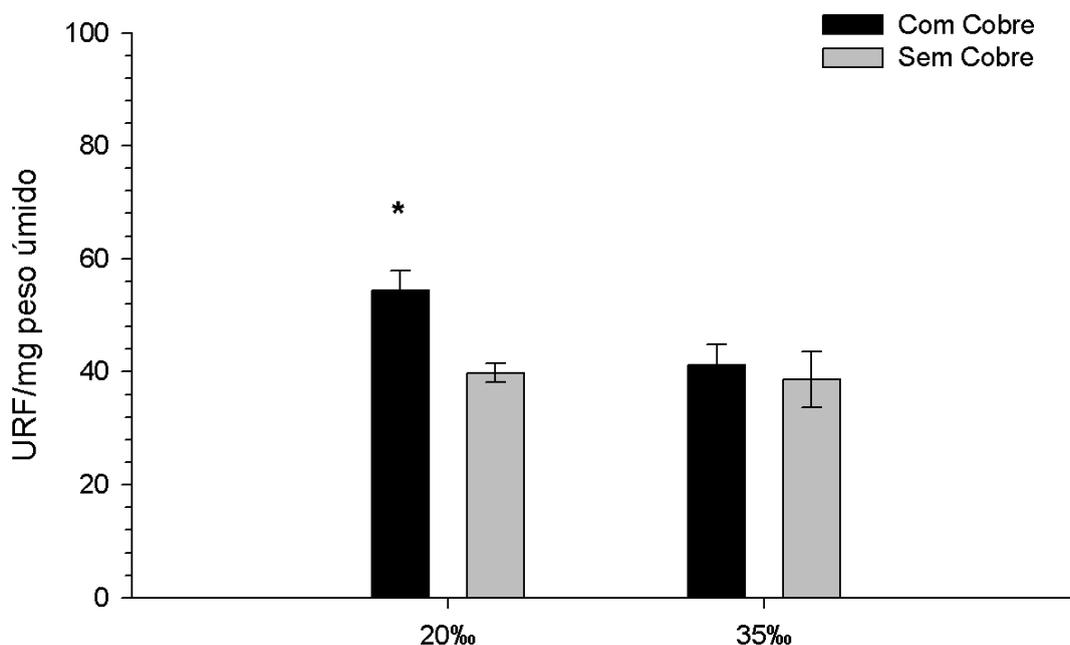
na atividade do MXR. Contudo, este mesmo artigo completa com a informação de que, a quantidade de fluorescência emitida em *Bunodosoma cangicum*, quando em solução salina hiposmótica, parece ter sido menor, sugerindo um aumento no fenótipo MXR. Um outro estudo mostrou que o acúmulo de calceína (um corante fluorescente) nas células do sistema imunológico do ouriço-do-mar tropical (*Echinometra lucunter*), foi maior na exposição à salinidade reduzida (25‰) e ao inibidor MK571, em comparação com salinidades mais altas (45‰) e ao inibidor reversina 205 (Honorato *et al.*, 2017).

4.5 Efeito de metais combinado à redução de salinidade

Quando os animais foram expostos a um estresse salino associado a um agente contaminante (metais) e então submetidos ao ensaio de acúmulo de rodamina-B, não houve diferença significativa na fluorescência emitida pelas brânquias quando o metal empregado foi o cádmio (Two Way Anova, $p > 0,05$). Entretanto, a exposição simultânea à salinidade reduzida (20‰) e ao cobre resultou em um aumento significativo no acúmulo de rodamina-B nas brânquias de *E. almeidai* (Two Way Anova, $p < 0,05$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Gráfico do efeito dos metais combinado à redução de salinidade no ensaio de acúmulo de rodamina-B nas brânquias do *E. almeidai*.





Fonte: Elaborada pela autora, 2025. Legenda: Fluorescência emitida pelo acúmulo de rodamina-B nas brânquias de espécimes de *E. almeidai* submetidos ao ensaio de acúmulo de rodamina-B após 24 horas de exposição à salinidade 35‰ e à salinidade reduzida 20‰ na ausência e presença dos metais Cádmio e Cobre. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão. (* indica diferença estatística entre os grupos salinidade 20‰ com e sem Cobre, Two Way Anova $p < 0.05$, $n = 4$).

Esse maior acúmulo de rodamina-B nas brânquias dos animais em salinidade reduzida, indica que as bombas de efluxo podem ter sido comprometidas pelo metal nessa salinidade, uma vez que na salinidade padrão não houve efeito do metal. Sabe-se que em salinidades reduzidas a disponibilidade do cobre aumenta, e isso promove um aumento da sua toxicidade. Diferentemente das salinidades padrões, onde os metais tendem a se associar aos sais já presentes na água, formando compostos que reduzem sua disponibilidade para os animais (Wang, 1987).

De acordo com Anjos *et al.* (2019), a presença do metal pesado aparenta reduzir os efeitos da salinidade, pois em seus resultados, a exposição ao cobre aumentou o fenótipo MXR em soluções com salinidade reduzida, na espécie *Bunodosoma cangicum*. Porém, um outro estudo demonstrou que, na solução salina hiposmótica o cobre a 1 μM não interferiu no acúmulo de rodamina-B, mas as concentrações de 5 e 10 μM do cobre foi capaz de mostrar uma tendência no acúmulo da rodamina-B (Anjos *et al.*, 2016).

Esse resultado reforça a importância de considerar múltiplos estressores ambientais simultaneamente, uma vez que sua combinação pode induzir efeitos fisiológicos que não seriam previsíveis a partir da exposição isolada a cada fator.

5 CONCLUSÃO

A atual pesquisa objetivou realizar um estudo para avaliar a expressão do fenótipo MXR em *Emerita almeidai*. Nossos resultados do efeito dos inibidores no ensaio de acúmulo da rodamina-B, evidenciaram que não houve diferença

estatística no acúmulo de rodamina-B quando os inibidores modelo estavam presentes, porém a diferença significativa ocorreu entre a autofluorescência do tecido (sem rodamina-B) e a fluorescência emitida pelas brânquias expostas a rodamina-B. Isso indica duas possíveis interpretações para esta espécie: 1) os transportadores normalmente que respondem a esses inibidores, podem não ter participação significativa na modulação do efluxo de rodamina-B nas condições experimentais utilizadas; e 2) a ausência da resposta esperada pode refletir uma baixa expressão desses transportadores. Um outro estudo obteve os mesmos resultados que os nossos ao utilizar os inibidores modelos, porém quando fizeram uso da reversina 205 (um outro inibidor) obtiveram uma maior fluorescência de rodamina-B em *Daphnia magna* (Vehniäinen e Kukkonen, 2015), logo é interessante realizar uma pesquisa futura para saber se esse inibidor (reversina 205) teria uma melhor resposta em comparação com os outros para o *Emerita almeidai*.

Avaliamos também a modulação do acúmulo de rodamina-B sob efeito dos metais, cobre e cádmio. De acordo com os resultados dessa etapa, a presença dos metais não gerou diferenças estatísticas significativas nas emissões de fluorescência de rodamina-B, indicando que as bombas de efluxo nas brânquias do *Emerita almeidai* não foram moduladas pelo efeito dos metais. No entanto, foi perceptível que no ensaio do cobre houve uma tendência de acúmulo de rodamina-B, isso pode ser explicado devido ao tamanho amostral não ter sido suficiente para constatar a ação deste metal em específico. Além disso, também ficou demonstrado uma não interação entre os metais e os inibidores com as proteínas ABC. Em suma, os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* indicam a importância de realizar investigações adicionais, utilizando diferentes inibidores e, possivelmente, outros metais em diferentes concentrações, a fim de aprofundar o conhecimento sobre as interações das proteínas transportadoras ABC de efluxo e a resistência a multixenobióticos em *Emerita almeidai*.

Por fim, verificamos o efeito das variações de salinidade isoladas e combinadas a metais no ensaio de acúmulo de rodamina-B. Nossos resultados nessa etapa demonstram que, as brânquias expostas as salinidades reduzidas não resultaram em diferenças significativas na emissão da fluorescência do acúmulo de rodamina-B, isto sugere que a diminuição de salinidade não influenciou o processo de acúmulo de rodamina-B, e, também, não provocou danos à integridade da barreira do epitélio branquial. Além disso, a redução de salinidade quando combinada aos metais mostrou que, na exposição ao cádmio não houve diferença significativa na fluorescência emitida, mas quando exposta ao cobre houve um aumento significativo do acúmulo de rodamina-B nas células branquiais do *Emerita almeidai*. Isto pode ser explicado pelo possível comprometimento das bombas de efluxo em função do metal nesta salinidade reduzida, uma vez que seu nível de toxicidade aumenta. Portanto, é importante destacar que seja feita uma avaliação de ações conjuntas dos múltiplos estressores ambientais, já que suas interações podem resultar em efeitos fisiológicos inesperados, que poderiam ser evitados pela exposição isolada a cada um deles.

Portanto, este estudo não identificou evidências robustas da atividade do fenótipo MXR em *Emerita almeidai* nas condições experimentais analisadas, o que limita, momentaneamente, sua aplicabilidade como biomarcador de contaminação aquática em praias arenosas. Assim, em futuras análises, recomenda-se que o *E. almeidai* seja testado com diferentes metodologias, inibidores e concentrações de contaminantes, a fim de verificar se a ausência de resposta observada reflete uma

baixa expressão dos transportadores associados ao mecanismo MXR, ou limitações metodológicas relacionadas aos protocolos empregados.

REFERÊNCIAS

ACHARD, M; BAUDRIMONT, M.; BOUDOU, U.; BOURDINEAUD, J. P. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 67, n. 4, p. 347-357, 2004.

ABBOTT, R. ABC Transporters, 2017. 1 vídeo (2 min). Publicado pelo canal Ryan Abbott. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=LwSKgrdomPM>. Acesso em: 30 mai. 2025.

AMADO, Enelise Marcelle. **O efeito do chumbo sobre a fisiologia celular branquial de crustáceos**. 2010. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J. C.; RAINBOW, P. S. **Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects**. Boca Raton - FL, CRC Press, 2016.

ANJOS, V. A.; GALVÃO, J. S.; SANTOS, V. R. S.; SOUZA, M. M. *Mesodesma mactroides* Gill Cells Exposed to Copper: Does Hyposmotic Saline Increase Cytotoxicity or Cellular Defenses? **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, p. 609-613, 2016.

ANJOS, Vanessa Abelaira. **Fenótipo MXR na anêmona do mar *Bunodosoma cangicum*: mecanismo de efluxo de cobre e influência da temperatura e salinidade**. 2017. Dissertação (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

ANJOS, V. A.; SANDRINI, J. Z.; MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. Characterization of MXR activity in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* exposed to copper. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, n. 202, p. 12-18, 2017.

ANJOS, V. A.; SANDRINI, J. Z.; SOUZA, M. M. MXR response in sea anemones: Effect of temperature, salinity and copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 226, 108609, 2019.

ASSEF, Y. A.; MISERENDINO, M. L.; HORAK, C. N. The Multixenobiotic Resistance Mechanism in species of invertebrates associated to an urban stream in the Patagonia Mountain. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225, n. 2164, 2014.

ATTRILL, M. A testable linear model for diversity trends in estuaries. **Journal of Animal Ecology**, v. 71, n. 2, p. 262-269, 2002.

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, n. 2, p. 27-36, 2012.

BARD, S. M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 357-389, 2000.

BARNES, K. M.; DICKSTEIN, B.; CUTLER, G. B.; FOJO, T.; BATES, S. E. Steroid transport, accumulation, and antagonism of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. **Biochemistry**, v. 35, p. 4820-4827, 1996.

BERGAMINO, L.; MUNIZ, P.; DEFEO, O. Effects of a freshwater canal discharge on polychaete assemblages inhabiting an exposed sandy beach in Uruguay. **Ecological Indicators**, v. 9, n. 3, p. 584-587, 2009.

BIELEN, A.; VLADUŠIĆ, T.; KUHARIĆ, N.; HUDINA, S.; ŠVER, L.; LIKIĆ, S.; BOŠNJAK, I. First evidence of the presence of Multixenobiotic Resistance Mechanism activity in freshwater invasive species, signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). **Periodicum Biologorum**, v. 116, n. 3, p. 267-273, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

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.

CONTRERAS, H.; DEFEO, O.; JARAMILLO, E. Life History of *Emerita analoga* (Stimpson) (Anomura, Hippidae) in a Sandy Beach of South Central Chile. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 48, n. 1, p. 101-112, 1999.

DAVENPORT, J.; DAVENPORT, J. L. The impact of tourism and personal leisure transport on coastal environments: A review. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 67, n. 1-2, p. 280-292, 2006.

DAVENPORT, J. The isolation response of mussels (*Mytilus edulis* L.) exposed to falling sea-water concentrations. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 59, n. 1, p. 123-132, 1979.

DE COEN, W. M.; JANSSEN, C. R.; GIESY, J. P. Biomarker applications in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology. **New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring**, p. 13-25, 2000.

DEELEY, R. G.; WESTLAKE, C.; COLE, S. P. C. Transmembrane Transport of Endo- and Xenobiotics by Mammalian ATP-Binding Cassette Multidrug Resistance Proteins. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 3, p. 849-899, 2006.

DEFEO, O.; CARDOSO, R. S. Latitudinal patterns in abundance and life-history traits of the mole crab *Emerita brasiliensis* on South American sandy beaches. **Diversity and Distributions**, v. 10, p. 89-98, 2004.

- DEFEO, O.; McLACHLAN, A. Patterns, processes and regulatory mechanisms in sandy beach macrofauna: A multi-scale analysis. **Marine Ecology Progress Series**, v. 295, p. 1-20, 2005.
- DEFEO, O.; McLACHLAN, A.; SCHOEMAN, D. S.; SCHLACHER, T.; DUGAN, J.; JONES, A.; LASTRA, M.; SCAPINI, F. Threats to sandy beach ecosystems: A review. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 81, n.1, p. 1-12, 2009.
- DUGAN, J. E.; HUBBARD, D. M.; WENNER, A. M. Geographic variation in life history of the sand crab, *Emerita analoga* (Stimpson) on the California coast: Relationships to environmental variables. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 181, n. 2, p. 255-278, 1994.
- DUGAN, J. E.; WENNER, A. M.; HUBBARD, D. M. Geographic variation in the reproductive biology of the sand crab *Emerita analoga* (Stimpson) on the California coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 150, n. 1, p. 63-81, 1991.
- EPEL, D.; LUCKENBACH, T.; STEVENSON, C. N.; MACMANUS-SPENCER, L. A.; HAMDOUN, A.; SMITAL, T. Efflux transporters: Newly Appreciated Roles in Protection against Pollutants. **Environmental Science and Technology**, 2008.
- EUTRÓPIO, F. J.; SÁ, F. S.; SÁ, H. S. Ecologia populacional de *Emerita brasiliensis* SCHIMITT, 1935 (Crustacea, Hippidae) de um trecho da praia de Itapoã, Vila Velha, Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, v. 4, n. 2, p. 67-71, 2006.
- FANINI, L.; MARCHETTI, G. M.; BACZEWSKA, A.; SZTYBOR, K.; SCAPINI, F. Behavioural adaptation to different salinities in the sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea : Amphipoda): Mediterranean vs Baltic populations. **Marine and Freshwater Research**, v. 63, n. 3, p. 275-281, 2012.
- 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. 569-570, p. 681-689, 2016.
- HAMDOUN, A.; EPEL, D. Embryo stability and vulnerability in an always changing world. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 104, p. 1745-1750, 2007.
- HIGGINS, C. F. Multiple Molecular Mechanisms for Multidrug Resistance Transporters. **Nature**, v. 446, p. 749-757, 2007.
- HOLLAND, B. ABC transporters, mechanisms and biology: an overview. **Essays in Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 1-17, 2011.
- 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.

HOOK, S. E.; GALLAGHER, E. P.; BATLEY, G. E. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 10, n. 3, p. 327-341, 2014.

IVANINA, A. V.; SOKOLOVA, I. M. Effects of cadmium exposure on expression and activity of P-glycoprotein in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 19-28, 2008.

JEONG, C. B.; KIM, B. M.; KIM, R. K.; PARK, H. G.; LEE, S. J.; SHIN, K. H.; LEUNG, K. M. Y.; RHEE, J. S.; LEE, J. S. 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.

JORGE-ROMERO, G.; LERCARI, D.; ORTEGA, L.; DEFEO, O. Long-term ecological footprints of a man-made freshwater discharge onto a sandy beach ecosystem. **Ecological Indicators**, v. 96, n. 1, p. 412-420, 2019.

KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1778, n. 9, p. 1781-1804, 2008.

KURELEC, B. Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. **The Science of the Total Environment**, v. 171, n. 1-3, p. 197-204, 1995.

KURELEC, B.; SMITAL, T.; PIVČEVIĆ, B.; EUFEMIA, N.; EPEL, D. Multixenobiotic Resistance, P-Glycoprotein, and Chemosensitizers. **Ecotoxicology**, v. 9, n. 5, p. 307-327, 2000.

KURELEC, B. The Multixenobiotic Resistance Mechanism in Aquatic Organisms. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 23-43, 1992.

LAURINO, I. R. A.; CHECON, H. H.; CORTE, G. N.; TURRA, A. Flooding affects vertical displacement of intertidal macrofauna: A proxy for the potential impacts of environmental changes on sandy beaches. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 245, 106882, 2020.

LEGEAY, A.; ACHARD-JORIS, M.; BAUDRIMONT, M.; MASSABUAU, J. C.; BOURDINEAUD, J. P. Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 3, p. 242-253, 2005.

LERCARI, D.; DEFEO, O. Effects of Freshwater Discharge in Sandy Beach Populations: The Mole Crab *Emerita brasiliensis* in Uruguay. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 49, p. 457-468, 1999.

LERCARI, D.; DEFEO, O. Large-scale diversity and abundance trends in sandy beach macrofauna along full gradients of salinity and morphodynamics. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 68, n. 1-2, p. 27-35, 2006.

LERCARI, D.; DEFEO, O. Variation of a sandy beach macrobenthic community along a human-induced environmental gradient. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 58, p. 17-24, 2003.

LINTON, K. J. Structure and Function of ABC Transporters. **Physiology**, v. 22, n. 2, p. 122-130, 2007.

LITMAN, T.; DRULEY, T. E.; STEIN, W. D.; BATES, S. E. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 7, p. 931-959, 2001.

LOPES, B. C. H.; AMADO, E. M.; OLIVEIRA-NETO, M. A.; ZAMPAULO, R. A.; ZEPPELINI, D. Multixenobiotic response of Collembola to soil contamination, the physiological basis for bioindicative environmental monitoring. **Chemosphere**, v. 349, 140851, 2024.

LOPES, B. C. H.; ZEPPELINI, D.; PONTES, D. S.; AMADO, E. M. First characterization of multixenobiotic activity in Collembola: An approach on cadmium-induced response. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, n. 239, 108850, 2021.

LOPES, Bruna Caroline Honório. **Identificação do mecanismo de resistência à multixenobióticos (MXR) em Collembola (Arthropoda, Hexapoda)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

LÜDERS, A. K.; SABOROWSKI, R.; BICKMEYER, U. Inhibition of multidrug/xenobiotic resistance transporter by MK571 improves dye (Fura 2) accumulation in crustacean tissues from lobster, shrimp, and isopod. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, n. 150, p. 368-371, 2009.

MACHADO, B.; GRASSI, B.; SEVERO, I.; BAHIMA, I.; SANTI, J. P. **Tatuira/Tatuí (*Emerita basiliensis*)**. Fauna digital - Rio grande do Sul. UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/tatuira-tatui-emerita-brasiliensis/#:~:text=Habitat%3A%20Zona%20entre%2Dmar%C3%A9s%20com,o%20Rio%20Grande%20do%20Sul>. Acesso em: 5 de maio de 2025.

MANTELATTO, F. L.; PAIXÃO, J. M.; ROBLES, R.; TELES, J. N.; BALBINO, F. C. Evidence using morphology, molecules, and biogeography clarifies the taxonomic status of mole crabs of the genus *Emerita* Scopoli, 1777 (Anomura, Hippidae) and reveals a new species from the western Atlantic. **ZooKeys**, v. 1161, p. 169-202, 2023.

MEMON, A. G.; MUSTAFA, A.; RAHEEM, A.; AHMAD, J.; GIWA, A. S. Impact of effluent discharge on recreational beach water quality: a case study of Karachi-Pakistan. **Journal of Coastal Conservation**, v. 25, n. 37, 2021.

MÜLLER, W.; STEFFEN, R.; RINKEVICH, B.; MATRANGA, V.; KURELEC, B. The multixenobiotic resistance mechanism in the marine sponge *Suberites domuncula*: its potential applicability for the evaluation of environmental pollution by toxic compounds. **Marine Biology**, v. 125, p. 165-170, 1996.

- NAVARRO, J. M. The effects of salinity on the physiological ecology of *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) (Bivalvia : Mytilidae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 122, n. 1, p. 19-33, 1988.
- NETO, J. X. S.; SIMPLICIO, A.; DEUCHER, K.; CUNHA, N. J. R.; ALMEIDA, T. C. M. Influência do ambiente na estrutura de tamanho e biomassa da *Emerita brasiliensis* (Schmitt, 1935) na Praia Brava e Guarda do Embaú. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 23, n. 1, 2019.
- OLDHAM, M. L.; DAVIDSON, A. L.; CHEN, J. Structural insights into ABC transporter mechanism. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 6, p. 726-733, 2008.
- POHL, Paula. Cristiane. **Participação dos transportadores ABC na destoxificação de Acaricidas no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2012. Dissertação (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- 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, n. 1, p. 56-67, 2012.
- SAFHI, M. M.; SIVAKUMAR, S. M.; JABEEN, A.; ZAKIR, F.; ISLAM, F.; ANWER, T.; BAGUL, U. S.; ELMOBARK, M. E.; KHAN, G.; SIDDIQUI, R.; HUSSIEN, A.; ALAM, M. F. Chapter 8 - Nanoparticle System for Anticancer Drug Delivery: Targeting to Overcome Multidrug Resistance. **Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics**, p. 159-169, 2017.
- SCHMITT, W. L. Crustacea Macrura and Anomura of Porto Rico and the Virgin Islands. Scientific Survey of Porto Rico and the Virgin Islands, **New York Academy of Sciences**, v. 15, n. 2, p. 125-227, 1935.
- SMITAL, T.; SAUERBORN, R. Measurement of the activity of multixenobiotic resistance mechanism in the common carp *Cyprinus carpio*. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3-5, p. 449-453, 2002.
- SPRITZER, R.; BARBOSA, J. V.; SILVA, J. A. B. Abundância da população de *Emerita brasiliensis* (Hippidae) em pontos na Praia do Leblon, Rio de Janeiro, Brasil. **Natureza on line**, v. 13, n. 2, p. 82-85, 2015.
- STEIN, W. D. Kinetics of the multidrug transporter (P-glycoprotein) and its reversal. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 2, p. 545-590, 1997.
- SUBRAMONIAM, T.; GUNAMALAI, V. Breeding biology of the intertidal sand crab, *Emerita* (Decapoda: Anomura). **Advances in Marine Biology**, v. 46, p. 91-182, 2003.
- SZAKÁCS, G.; PATERSON, J. K.; LUDWIG, J. A.; BOOTH-GENTHE, C.; GOTTESMAN, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 219-234, 2006.

SZAKÁCS, G.; VÁRADI, A.; ÖZVEGY-LACZKA, C.; SARKADI, B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9-10, p. 379-393, 2008.

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: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, n. 4, p. 496-503, 2007.

TO, K. K. W.; WU, M.; TONG, C. W. S.; YAN, W. Drug transporters in the development of multidrug resistance in colorectal cancer. **Drug Resistance in Colorectal Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies**, v. 8, p. 35-55, 2020.

TORRE, C. D.; BOCCI, E.; FOCARDI, S. E.; 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.

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

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S. P.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. Boca Raton - FL, CRC Press, 2012.

WALLNER-KERSANACH, 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.

WANG, W. Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms - overview. **Environment International**, v. 13, n. 6, p. 437-457, 1987.

WILKENS, S. Structure and mechanism of ABC transporters. **F1000 Prime Reports**, v. 7, n. 14, 2015.

WU, G.; ZHU, J.; LI, K.; GAO, X.; HU, C.; CHENG, J.; YE, G. A proteomic analysis of larval midguts of *Boettcherisca peregrina* in response to cadmium exposure. **Bulletin of Insectology**, v. 66, n. 2, p. 225-229, 2013.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Enelise Marcelle Amado, por ter me aceito no LEFA e ter me orientado durante toda a realização do TCC. Agradeço, também, por todos os momentos de risadas e aprendizados, dentro e fora da sala de aula.

À banca examinadora do meu TCC, Prof. Dr. Elvio Sergio Figueiredo Medeiros e Me. Dr^ª. Bruna Caroline Honório Lopes, por terem aceito fazer parte deste momento importante de conclusão de curso. Ao Prof. Dr. Elvio, agradeço todos os conhecimentos passados nas disciplinas durante minha graduação. À Me. Dr^ª. Bruna, agradeço pelos conhecimentos que virão nas considerações da correção do TCC.

À todo o pessoal do LEFA, em especial Larissa Rafaela Caetano da Silva, Adolpho Vicente de Albuquerque Bisneto e Ana Clara da Silva Moraes, por terem ajudado nas coletas dos tatuís, na realização dos experimentos e até compartilhado ideias para acrescentar na pesquisa, além das novas amizades que esse laboratório me proporcionou.

Ao motorista da faculdade, Ricardo, por ter nos levado aos locais de coleta sempre com paciência e simpatia.

À Luísa, filha da professora Enelise, por ter ajudado na coleta dos tatuís e ter alegrado o momento.

À Prof^ª. Célia Cristina Clemente Machado, ao Prof. Cleber Ibraim Salimon e ao colega Antonio Junio Nonato da Silva (graduando em ciências biológicas na UEPB-Campus V), por terem me ajudado na elaboração do mapa dos locais de coleta.

Aos colegas que me acompanharam em todos os momentos da faculdade, Ellen Cristina Silva, Adriana Alencar de Souza, Miguel Ribeiro de Sousa Neto, Wesley Ruan Fernandes Bezerra e Leticia Moura Oliveira.

Aos meus amigos pessoais de fora da faculdade, Letícia, Sarah, Malu, Luana, Delgado, Chesco, Accioly, Camila e Lucas, por todo o apoio e carinho que eles me deram durante minha graduação, em momentos de crise e momentos de alegria.

Aos meus pais, Vera e Carlos, por todo o apoio, ajuda, compreensão, carinho e cuidado que sempre tiveram e têm comigo.

À minha família, por me apoiar e incentivar a realizar meus sonhos.