



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/ZOOLOGIA

IDENTIFICAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA À  
MULTIXENOBIÓTICOS (MXR) EM COLLEMBOLA (ARTHROPODA,  
HEXAPODA)

MESTRANDA: BRUNA CAROLINE HONÓRIO LOPES  
PROFESSOR ORIENTADOR: DOUGLAS ZEPPELINI FILHO  
PROFESSORA CO-ORIENTADORA: ENELISE MARCELLE AMADO

JOÃO PESSOA - PB

2019

**BRUNA CAROLINE HONÓRIO LOPES**

**Identificação do Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos (MRX) em  
Collembola (Arthropoda, Hexapoda)**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Zoologia (PPGCB) da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Douglas Zeppelini Filho

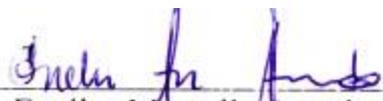
JOÃO PESSOA - PB

2019

**BRUNA CAROLLINE HONÓRIO LOPES**

**Identificação do Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos (MRX) em  
Collembola (Arthropoda, Hexapoda)**

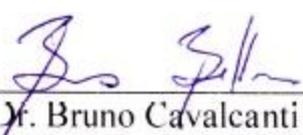
Banca examinadora

  
Dra. Enelise Marcelle Amado (2º Orientador)

Presidente. Co-orientadora (Universidade Estadual da Paraíba)

  
Dr. Douglas Zeppelini Filho (Orientador)

Orientador (Universidade Estadual da Paraíba)

  
Dr. Bruno Cavalcanti Bellini (titular)

Membro titular (Universidade Federal do Rio Grande do Norte)

  
Dra. Daniela Santos Pontes (Titular)

Membro titular (Universidade Estadual da Paraíba)

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Douglas Zeppelini por ter sido minha fonte de inspiração, pela orientação desde o início de minha vida acadêmica, pelas ideias, persistência e por acreditar em meu potencial sempre. À Prof. Dra. Enelise Amado por toda paciência em me ensinar o mundo novo da fisiologia, pela dedicação, coleguismo e principalmente, pela amizade que construímos. Sem vocês nada seria possível, muito obrigada, por tudo.

À Deus, por ter me permitido chegar até aqui.

À Capes pelo financiamento da pesquisa.

Ao Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas - LSVM pela parceria.

Aos meus companheiros de laboratório por todo apoio e ajuda necessária, aqui destaco Idalio Amaranto, Nathan Brito, João Victor, Estevam Lima, Roniere Brito e Otoniel Lima que sempre me ajudaram em tudo que precisei. Obrigada.

À minha família pelo amor a mim e ao que faço, pelo orgulho e pelo apoio a minha vida profissional. Em especial, meu muito obrigado à minha mãe, Rosa Honório, meu irmão, Thiago Luize minha prima, Marcela Melo por estarem comigo em todos os momentos da minha vida. Obrigada por entenderem a relevância do meu trabalho e, sobretudo, por entenderem meus dias difíceis na pesquisa. Muito obrigada.

Ao meu namorado, Ernane Cintra, pelo companheirismo, paciência, dedicação durante todo o mestrado. Muito obrigada por acreditar em mim sempre. Aos meus segundos pais, Symone Lucena e Alexandre Brandão, pelo amor e acolhimento todos esses anos.

Aos meus amigos, Karina Pacheco, Gabrielly Duarte, Jôingrid da Silva, Maria Helena, César Costa e Jessé Miranda, por todas as conversas esclarecedoras, motivadoras, auxílio e companheirismo. Obrigada por todos os momentos de amizade que me proporcionaram durante toda a pesquisa.

Por fim, agradeço à todos que fizeram parte deste importante período da minha vida, meu muito obrigado.

“Tanto tempo, tanto esforço, tanto dinheiro, muitas vezes para se conseguir resultados pequenos quando comparados com as horas investidas. Mas todas as frustrações e todos os esforços monótonos, repetitivos, tornam-se insignificantes diante da alegria pura de descobrir algo novo - e esse prazer pode ser saboreado quase todos os dias quando também se ama as pequenas coisas. Dizer: Nós descobrimos isso; nós compreendemos isso; nós conseguimos extrair sentido e ordem da confusão da natureza. Pode existir recompensa maior?”

**Stephen Jay Gould**

## RESUMO

A classe Collembola compreende um grupo de pequenos artrópodes, podendo variar de 0,12 mm a 12 mm, considerados como hexápodes basais, entognatos e ápteros. São utilizados como indicadores de perturbação e de qualidade do solo e são eficientes indicadores da qualidade do ambiente, uma vez que respondem rapidamente às alterações ambientais. A espécie *Folsomia candida* é considerada a espécie padrão para testes ecotoxicológicos, porém, a investigação de espécies nativas pode representar uma abordagem interessante. O objetivo do presente trabalho foi identificar a atividade do Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos (MXR) no intestino de 3 espécies nativas e amplamente distribuídas no país: *Trogolaphysa* sp., *Cyphoderus similis* e *Cyphoderus innominatus*. O mecanismo MXR, já identificado em diversos filos animais, se localiza em epitélios em contato com o meio externo e utiliza proteínas transportadoras para eliminação de contaminantes. Para encontrar a atividade do mecanismo, foram realizados ensaios *in vitro* do acúmulo do fluorescente rodamina-B na presença do cloridrato de verapamil, um conhecido inibidor da P-gp (glicoproteína P), e do MK571, um conhecido inibidor da MRP (*multidrug related protein*), ambas bombas de efluxo relacionadas ao mecanismo MXR. O ensaio do acúmulo de rodamina-B, também foi realizado na presença de um metal pesado, o cádmio, para investigar a interação desse metal com o mecanismo MXR. Nossos resultados indicam a atividade de bombas de efluxo no intestino das três espécies de Collembola (*C. similis*, *C. innominatus* e *Trogolaphysa* sp.), sendo estas bombas a base do Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos (MXR). Encontramos ainda que, em *C. similis* e *Trogolaphysa* sp. a atividade do mecanismo aumenta em resposta à uma concentração muito baixa de um metal pesado amplamente encontrado em solos contaminados, o cádmio.

Palavras-chave: Cádmio, MK571, rodamina-B, verapamil.

## ABSTRACT

The Collembola class comprises a group of small arthropods, ranging from 0.12 mm to 12 mm, considered as basal hexapods, entognatha and aptera. They are used as indicators of disturbance and soil quality and are efficient indicators of the quality of the environment, because they respond quickly to the environmental changes. The species *Folsomia candida* is considered the standard species for ecotoxicological tests, however, the investigation of native species represents an interesting approach. The objective of the present work was to investigate the activity of the Mechanism of Resistance to Multixenobiotics (MXR) in the gut of 3 native species richly distributed in the country: *Trogolaphysa* sp., *Cyphoderus similis* and *Cyphoderus innominatus*. The MXR mechanism, already identified in several animal groups, is located in epithelia in contact with the external environment and uses carrier proteins to eliminate contaminants. In order to find the mechanism activity, *in vitro* tests were performed in the rhodamine-B accumulation assay in the presence of verapamil hydrochloride, a known P-gp (P-glycoprotein) inhibitor, and MK571, a known MRP (multidrug related protein) inhibitor, both efflux pumps related to the MXR mechanism. In addition to the rhodamine-B accumulation assay, other tests were performed involving rhodamine-B in the presence of a heavy metal, the cadmium, to investigate the interaction of this metal with the MXR mechanism. Our results indicate the activity of efflux pumps in the intestines of three species of Collembola (*C. similis*, *C. innominatus* and *Trogolaphysa* sp.), being these pumps the basis of the Mechanism of Resistance to Multixenobiotics (MXR). We also find that, in *C. similis* and *Trogolaphysa* sp., increase in the mechanism activity in response to a very low concentration of a heavy metal widely found in contaminated soils, cadmium.

Key words: Cadmium, MK571, rhodamine-B, verapamil.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Funcionamento do mecanismo MXR (Fonte: Farmacologia básica e clínica KATZUNG, 2014)).....	14
Figura 2 - Ensaio de acúmulo da rodamina-B <i>in vitro</i> .....	18
Figura 3 - Ensaio do acúmulo de rodamina <i>in vitro</i> na presença do sulfato de cádmio.....	19
Figura 4 - Autofluorescência (A) e acúmulo de rodamina-B (B) em 3 espécies de Collembola.....	22
Figura 5 - Acúmulo relativo de rodamina-B na presença dos inibidores da P-gp.....	24
Figura 6 - Ensaio do acúmulo da rodamina-B na presença dos inibidores e do sulfato de cádmio.....	26

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	11
1.1. Classe Collembola.....	11
1.2. Espécies escolhidas.....	11
1.3. O Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos.....	13
<b>2. Objetivos</b> .....	16
2.1. Objetivos gerais.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
<b>3. Metodologia</b> .....	17
3.1. Reagentes utilizados.....	17
3.2. Animais experimentais.....	17
3.3. Atividade do mecanismo MXR.....	18
3.4. Testes e protocolos experimentais.....	18
3.4.1. Ensaio do acúmulo de rodamina-B <i>in vitro</i> .....	18
3.4.2. Ensaio do acúmulo de rodamina-B <i>in vitro</i> na presença do sulfato de cádmio.....	19
3.5. Análises estatísticas.....	20
<b>4. Resultados</b> .....	22
<b>5. Discussão</b> .....	28
<b>6. Conclusões</b> .....	33
<b>7. Referências bibliográficas</b> .....	34

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CLASSE COLLEMBOLA

A classe Collembola (LUBBOCK, 1873) compreende um grupo de pequenos artrópodes, podendo variar de 0,12 mm a 17 mm, considerados como hexápodes basais, entognatos e ápteros (KRISTENSEN, 1981; BRETTFELD, 1999; BELLINGER *et al.*, 1996 - 2013). Estes animais são extremamente importantes nos ecossistemas pois eles estão na base da cadeia alimentar e atuam no processo de decomposição, juntamente com os demais invertebrados da mesofauna, tornando a matéria orgânica disponível mais rapidamente para as raízes no solo. Além disto, o grupo é responsável pela dispersão de fungos e bactérias (decompositores), sendo fundamentais na ciclagem de nutrientes (ZEPPELINI & BELLINI, 2004). Também são utilizados como indicadores de perturbação e de qualidade do solo (STORK & EGGLETON, 1992; MANH VU & NGUYEN, 2000). O fato de possuírem um curto ciclo de vida e gerações numerosas reforça o papel de serem eficientes indicadores da qualidade do ambiente, uma vez que respondem mais rapidamente às alterações ambientais (FREITAS *et al.*, 2004).

Os colêmbolos possuem uma ampla distribuição no mundo e podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes terrestres disponíveis, como cavernas, desertos, glaciares, dossel de árvores, ninhos de vertebrados e insetos, rochas das zonas litorais de entremarés, dentro de carapaças de caranguejos ermitões (Paguroidea), e em áreas de manguezais (CHRISTIANSEN, 1964; BELLINGER, 1985; GREENSLADE, 1991; DEHARVENG, 1996; JORDANA *et al.*, 1997; PALACIOS-VARGAS *et al.*, 2000; ZEPPELINI & BELLINI, 2004). A riqueza de espécies e a densidade de populações de colêmbolos são influenciadas por muitos aspectos do solo como a aeração, o pH, a composição da matéria orgânica, a disponibilidade de nutrientes, o tipo de húmus, o efeito da cobertura vegetal e estrutura física do solo (ZEPPELINI *et al.*, 2009). No Nordeste foram registradas 70 espécies de Collembola, 33 delas no estado da Paraíba (ZEPPELINI *et al.*, 2019).

### 1.2. ESPÉCIES ESCOLHIDAS

A espécie *Folsomia candida* Willem, 1902 tem sido utilizada para testes com contaminantes de solo e/ou alimentos para examinar como esta contaminação afeta parâmetros da história de vida, bioacumulação e/ou o comportamento. Tais testes avaliam

a toxicidade de uma ampla gama de poluentes orgânicos e inorgânicos e têm sido utilizados como bioensaios para monitorar o sucesso da remediação de solos (KRATZ & RIESBECK, 1998; FAVA & BERTIN, 1999; SCHÄFER & ACHAZI, 1999; JUVONEN et al., 2000; FAVA & PICCOLO, 2001; GEJLSBIERG et al., 2001; VAN GESTEL et al., 2001; CROUAU et al., 2002; FRISCHE, 2003; CZARNETZKI & TEBBE, 2004). A Organização Internacional para Padronização (ISO) publicou um protocolo para o uso de *Folsomia candida* como espécie padrão para testes ecotoxicológicos (ISO, 1999).

O gênero *Trogolaphysa*, que possui espécies amplamente distribuídas no Brasil, tem um total de 69 espécies descritas (BELLINGER et al., 1996-2017), oito delas registradas no Brasil: *T. hirtipes*, Handchin, 1924; *T. millsi*, Arlé, 1939; *T. aelleni*, Yoshii, 1988; *T. hauseri*, Yoshii, 1988; *T. hirtipes*, Handchin, 1924; *T. tijucana*, Arlé & Guimarães, 1979; *T. formosensis*, Silva & Bellini, 2015; *T. ernesti*, Bellini & Cipola, 2017; *T. piracurucaensis*, Nunes & Bellini, 2018 (ABRANTES et al., 2012, SILVA & BELLINI, 2015; BELLINI & CIPOLA, 2017; NUNES & BELLINI, 2018). O gênero é o maior da família Paronellidae no Brasil, abrigando um terço das espécies conhecidas da família (ARLÉ, 1939; ARLÉ & GUIMARÃES, 1979; YOSHII, 1988; ABRANTES et al., 2010-2012).

Assim como as espécies do gênero anterior, o gênero *Cyphoderus* Nicolet, 1842 tem atualmente 76 espécies descritas em todo o mundo (SOTO-ADAMES et al., 2008; BELLINGER et al., 1996-2017, NUNES & BELLINI, 2018). Os representantes do gênero no Brasil incluem seis espécies: *C. agnotus*, Börner, 1906; *C. similis*, Folsom, 1927; *C. innominatus*, Mills, 1938; *C. arlei*, Cassagnau, 1963; *C. caetetus*, Zeppelini & Oliveira, 2016 e *C. equidenticulati*, Nunes & Bellini, 2018.

Embora a espécie *Folsomia candida* seja considerada a espécie padrão para testes ecotoxicológicos (ISO, 1999), a investigação de espécies nativas pode representar uma abordagem interessante, sabendo que as espécies escolhidas são bem distribuídas em todo o território brasileiro e sua manutenção em laboratório ser fácil e de baixo custo, além de sobreviverem e reproduzir-se em temperaturas de 22-23 °C.

Diversos estudos foram publicados (FIREA, 2009; SAHANA & JOY, 2016; OLIVEIRA FILHO et al., 2017; SILLAPAWATTANA & SCHÄFFER, 2017; LIU et al., 2018) relatando a resistência de Collembola à poluição, pesticidas, metais pesados e solos contaminados, ressaltando ainda mais a sua utilização como bioindicadores da qualidade

do solo. Nestes estudos, foi analisado a capacidade de *Collembola* a sobreviver em solos contaminados com pesticidas e metais pesados. Os resultados sugerem que os colêmbolos são sensíveis a pequenas alterações na qualidade ambiental e por isto, são excelentes bioindicadores.

### 1.3. O MECANISMO DE RESISTÊNCIA À MULTIXENOBIÓTICOS (MXR)

A maioria dos animais conhecidos possuem mecanismos para lidar com contaminantes presentes no ambiente. Um desses mecanismos é o Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos (MXR), localizado nos epitélios em contato com meio externo e que se utiliza de proteínas transportadoras de efluxo para eliminação de contaminantes. O MXR é mediado por proteínas de transporte transmembranares da família ABC que transferem uma ampla gama de substratos como aminoácidos, peptídeos, vitaminas, açúcares, lipídios, esteróis, hormônios, metabólitos endógenos, inorgânicos ânions, drogas e íons metálicos. O transporte é feito de dentro e fora das células com o uso de ATP (Figura 1), através de membranas celulares contra um gradiente de concentração e estão presentes em todos organismos, incluindo plantas, vertebrados, invertebrados e micróbios (HOLLAND *et al.*, 2003; LICHT & SCHNEIDER, 2011).

A família de transportadores ABC consiste em 7 subfamílias distintas. Uma delas é a subfamília é a ABCB (MDR1, ABCB1) que comporta o sistema MDR (resistência a múltiplos fármacos). A principal proteína desse sistema, a glicoproteína-P (glicoproteína de permeabilidade, P-gp), está envolvida na resistência à múltiplas drogas e corresponde a um transportador de efluxo, suas principais funções estão relacionadas ao mecanismo de resistência à múltiplos fármacos e aumento do efluxo de drogas das células (GERMANN, 1993; REEH *et al.*, 2012). Através da ligação e hidrólise do ATP, este mecanismo promove o bombeamento para fora das células de uma grande variedade de substratos endógenos e exógenos, limitando assim a sua acumulação e potencial toxicidade (SZAKACS *et al.*, 2008). Outro conhecido mecanismo de eliminação de toxinas é o MRP (Multi drug Resistance associated Proteins), pertencente à família ABCC, que foi identificado em mamíferos, peixes e outros animais (ZAJA *et al.*, 2007). O seu inibidor específico é o MK571 (LÜDERS *et al.*, 2009).

Os inibidores do MXR podem ser divididos em duas classes principais: os primeiros são inibidores competitivos e os não competitivos. Os inibidores competitivos

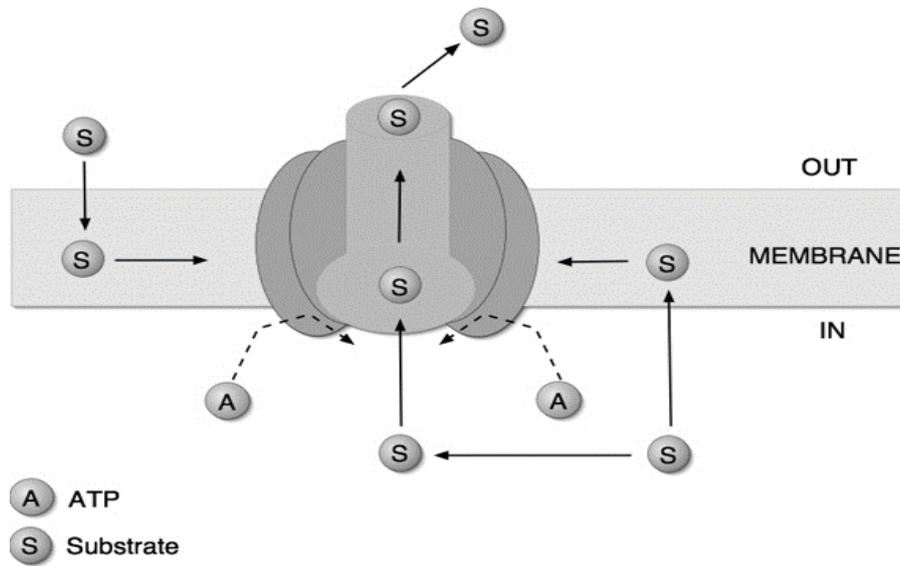
atuam como substratos de alta afinidade pela P-gp, impedindo a ligação e o transporte ativo de outros substratos/xenobióticos. Um exemplo típico é verapamil. Os inibidores não competitivos que pode agir de várias maneiras, por exemplo, bloqueando a atividade da ATPase da P-gp, que é necessária para o transporte de xenobióticos mediado por ATP em toda a membrana plasmática, como por exemplo, a ciclosporina A. Com base nestes recursos, o verapamil e a ciclosporina A são frequentemente usados como controles positivos em experimentos de atividade de transporte de P-gp (BARNES *et al.*, 1996; STEIN, 1997).

O MXR já foi bem caracterizado em diversos filos aquáticos e é bastante utilizado em estudos de biomonitoramento deste ambiente (KURELEC, 1995; SMITAL & KURELEC, 1998; MINIER *et al.*, 2000; JEONG *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2018), também em invertebrados e artrópodes. A atividade do sistema MXR pode ser utilizada como biomarcador de exposição e pode ser uma importante ferramenta também para a biomonitoramento do solo (BOŠNJAK *et al.*, 2014). Apesar de raros, alguns estudos têm investigado o Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos na fauna do solo, mas apenas utilizando minhocas como organismo modelo. Evidências da presença de bombas de efluxo, utilizando o ensaio de acúmulo de rodamina-B, foram encontradas na espécie *Eisenia andrei*, Bouché, 1972 (HACKENBERGER *et al.*, 2012; VELKI & HACKENBERGER, 2012). Em *Eisenia fetida*, Savigny, 1826, além da atividade de bombas de efluxo, identificada pelo ensaio de acúmulo de rodamina na presença de inibidores como verapamil e MK571, também foi encontrada expressão gênica da P-gp (BOŠNJAK *et al.*, 2014).

Ao longo dos últimos anos, a classe Collembola foi bastante utilizado para testes de toxicidade com metais pesados e outros poluentes (VAN STRAALLEN *et al.*, 1989; VAN GESTEL & HENSBERGEN, 1997; VAN GESTEL & VAN DIEPEN, 1997; CIPOL & VAUGHAN, 2003; KUPERMAN *et al.*, 2004; GUIMARÃES, *et al.*, 2018), avaliando-se principalmente sua capacidade de sobrevivência e reprodução em solos contaminados. Entretanto, nada se sabe a respeito da presença de bombas de efluxo para eliminação de tais xenobióticos em organismos da fauna de solo, além das espécies de minhoca, *E. fetidae* e *E. andrei*. A investigação da presença dessas bombas de efluxo em Collembola é inédita e se torna bastante relevante, uma vez que são animais de grande importância ecológica e que funcionam como bioindicadores, sendo considerados um dos grupos de

artrópodes terrestres mais difundidos e abundantes. Este trabalho pode ser a base para estudos de ecotoxicologia no Brasil, por usar espécies nativas como enfoque.

Figura 1 - Funcionamento do mecanismo MXR (Fonte: Farmacologia básica e clínica (KATZUNG, 2014))



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAIS

Avaliar a atividade do mecanismo MXR em três espécies nativas de Collembola ..

### 2.2. ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a atividade do mecanismo MXR no intestino de *C. similis*, *C. innominatus* e *Trogolaphysa sp.*, através do ensaio de acúmulo de rodamina-B, na presença e ausência dos inibidores verapamil e MK571;
- b) Analisar a influência de um metal pesado, o cádmio, na atividade do mecanismo MXR no intestino de *C. similis*, *C. innominatus* e *Trogolaphysa sp.*;

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. REAGENTES UTILIZADOS:

Os reagentes utilizados foram a rodamina-B (2,5  $\mu\text{M}$ ), cloridrato de verapamil (20  $\mu\text{M}$ ), MK571 (10  $\mu\text{M}$ ), sulfato de cádmio (1  $\mu\text{M}$ ) e solução salina para artrópodes, adaptada para *Collembola* (tabela 1).

Tabela 1 - Composição e molaridade da solução salina para *Collembola*.

Reagentes	mM	g/L
NaCl	140	8,1816
KCl	3	0,2236
NaHCO <sub>3</sub>	18	4,4366
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3	0,4410
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	5	0,9008
Glicose	5	1,1800
Hepes	2	0,1600

#### 3.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os indivíduos das espécies *Trogolaphysa* sp., *C.similis* e *C. innominatus* foram obtidos através de coletas visuais, utilizando o auxílio de aspiradores entomológicos, numa área verde do Campus V da Universidade Estadual da Paraíba, localizada na cidade de João Pessoa, Paraíba (7°09'29''S, 34°51'59''N). Foram coletados aproximadamente 15 indivíduos de cada espécie, que em seguida passaram por uma triagem e identificação, e então, depositados em cultivos artificiais.

Os cultivos artificiais foram estabelecidos na temperatura de 22 °C, mantida através de um aparelho de ar condicionado, na ausência de luminosidade e colocados dentro de recipientes de plástico laboratoriais tampados (capacidade de 600 ml aproximadamente), com substrato composto húmus esterilizado. Os organismos foram alimentados a cada 7 dias com água destilada e a cada 4 dias com uma ração composta por spirulina, macarrão, arroz e levedura de cerveja.

### 3.3. ATIVIDADE DO MECANISMO MXR:

O teste da atividade do mecanismo MXR foi realizado por meio de ensaio de acúmulo do fluoróforo rodamina-B, um método indireto de identificar e quantificar a atividade da glicoproteína P (P-gp) (base molecular do mecanismo) como descrito por Kurelec e colaboradores (2000). A rodamina-B, por ser substrato da P-gp e de outras bombas de efluxo, ao entrar na célula é constantemente bombeada para fora. Dessa forma, a presença de bombas de efluxo na membrana celular previne o acúmulo da rodamina-B no meio intracelular (KURELEC, 1995). A administração da rodamina-B associada a um inibidor dessas bombas de efluxo indica a presença do mecanismo, porque a inativação do efluxo levará a um acúmulo do fluorescente dentro da célula. Dessa forma, quanto maior o acúmulo de rodamina dentro da célula, menor a atividade das bombas de efluxo, e vice e versa. Dois inibidores foram usados: o cloridrato de verapamil (20  $\mu$ M), um conhecido inibidor da P-gp, e o MK571 (5  $\mu$ M), um inibidor da MRP.

Em *Collembola*, o intestino foi utilizado para investigar a presença do mecanismo MXR, por ser um extenso epitélio de troca e importante via de entrada de poluentes (FOUNTAIN & HOPKIN, 2004). Por este epitélio não estar em contato direto com o solo, todos os reagentes utilizados na experimentação foram administrados de forma *in vitro*, ou seja, os intestinos foram dissecados e cortados longitudinalmente para que as proteínas relacionadas ao sistema MXR pudessem ficar expostas para interação com os reagentes.

### 3.4. TESTES E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 3.4.1. Ensaio do acúmulo da rodamina-B *in vitro*

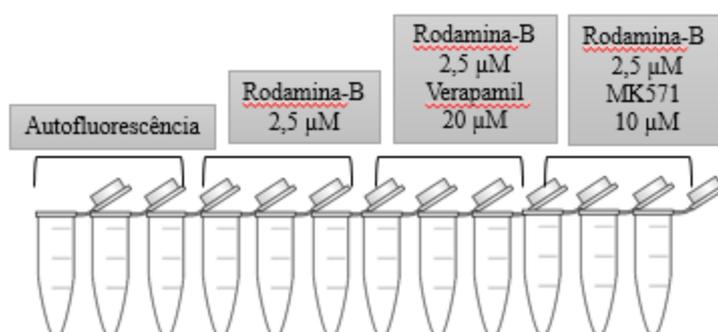
Este primeiro teste teve como objetivo identificar indiretamente a presença do mecanismo MXR em *Collembola* utilizando dois inibidores do mecanismo.

O protocolo experimental seguiu-se da seguinte forma: para cada espécie, 12 indivíduos eram retirados do cultivo artificial utilizando aspiradores entomológicos. Após a captura dos indivíduos, foi feita a crioanestesia por 10 minutos em freezer (aproximadamente -10°), em seguida, os indivíduos eram pesados em uma balança analítica de precisão 0,00001g (modelo AUW-220D, marca SHIMADZU). A amostragem do tecido foi realizada através da dissecação e corte longitudinal do intestino com auxílio de alfinetes entomológicos e solução salina. Após este processo, os intestinos

eram passados para frascos do tipo Eppendorf que continham 200  $\mu$ l de solução salina (grupo 1 controle - eppendorfs 1, 2 e 3), 195  $\mu$ l de solução salina e 5  $\mu$ l da solução estoque de rodamina (grupo 2 rodamina 2,5  $\mu$ M eppendorfs 4, 5 e 6 -), 155  $\mu$ l do estoque de solução salina, 5  $\mu$ l da solução estoque de rodamina-B e 40  $\mu$ l da solução estoque de cloridrato de verapamil (grupo 3 rodamina 2,5  $\mu$ M + verapamil 20  $\mu$ M eppendorfs 7, 8 e 9 -) e, por último, 192,8  $\mu$ l do estoque de solução salina, 5  $\mu$ l da solução estoque de rodamina-B e 2,2  $\mu$ l da solução estoque de MK571 (grupo 4 rodamina 2,5  $\mu$ M + MK571 10  $\mu$ M - eppendorfs 10, 11 e 12 -). Os eppendorfs foram guardados em um local sem luz e refrigerado por 1 hora. Após 1 hora, os eppendorfs foram colocados numa centrífuga à 20°C, rotação de 2000 g por 5 minutos e o conteúdo dos eppendorfs foi substituído por solução salina. Esse procedimento de lavagem do material foi repetido mais 2 vezes. Após a lavagem, os intestinos foram pipetados com 200 $\mu$ l de solução salina em poços individuais de uma microplaca preta opaca de 96 poços. A fluorescência emitida pela rodamina acumulada nos intestinos foi lida à 544 nm de excitação e 590 nm de emissão em uma leitora de microplacas (EspectraMax I3, Molecular Devices). A fluorescência lida foi normalizada em função do peso de cada indivíduo. Todo esse procedimento foi repetido 8 vezes, totalizando um n de 24 intestinos para cada condição experimental.

O total de indivíduos utilizados nesse ensaio foi de n=288, sendo n=96 por espécie estudada.

Figura 2 - Ensaio de acúmulo da rodamina-B *in vitro*.



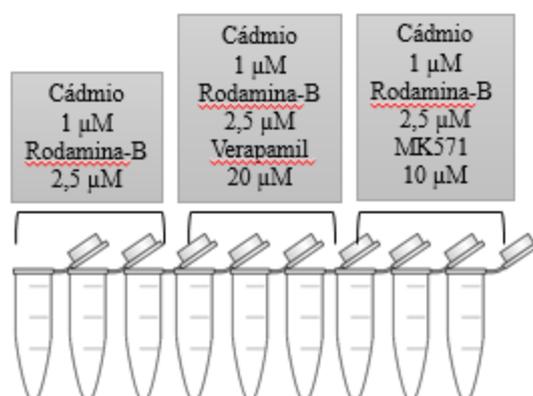
#### 3.4.2. Ensaio do acúmulo de rodamina *in vitro* na presença do sulfato de cádmio

Este teste teve como objetivo elucidar como um metal pesado pode interferir diretamente na atividade do mecanismo de defesa MXR.

O protocolo experimental seguiu-se da seguinte forma: para cada espécie, 9 indivíduos eram retirados do cultivo artificial utilizando aspiradores entomológicos. Após a captura dos indivíduos, foi feita a crioanestesia por 10 minutos em freezer (aproximadamente-10°), em seguida, os indivíduos eram pesados em uma balança analítica de precisão 0,00001g (modelo A UW-220D, marca SHIMADZU). A amostragem do tecido foi feita através da dissecação e corte longitudinal do intestino com auxílio de alfinetes entomológicos e solução salina, assim como ocorria no início da experimentação anterior. Após o processo de dissecação e corte, os intestinos eram passados para eppendorfs que continham 193 µl de solução salina, 2 µl da solução estoque de sulfato de cádmio e 5 µl da solução estoque de rodamina-B (grupo 1 rodamina 2,5 µM + cádmio 1 µM -eppendorfs 1, 2 e 3) -, 153 µl do estoque de solução salina, 2 µl da solução estoque de sulfato de cádmio, 5 µl da solução estoque de rodamina-B e 40 µl da solução estoque de cloridrato de verapamil (grupo 2 rodamina 2,5 µM + verapamil 20 µM + cádmio 1 µM -eppendorfs 4, 5 e 6) - e, por último, 190,8 µl do estoque de solução salina, 2 µl da solução estoque de sulfato de cádmio, 5 µl da solução estoque de rodamina-B e 2,2 µl da solução estoque de MK571 (grupo 3 rodamina 2,5 µM + MK571 10 µM + cádmio 1 µM -eppendorfs 7, 8 e 9) -. Após 1 hora de exposição, seguiu-se o mesmo protocolo do teste anterior, centrifugação, lavagem e leitura de fluorescência. Todo o procedimento foi repetido 8 vezes, totalizando um n de 24 intestinos para cada condição experimental.

O total de indivíduos utilizados nesse ensaio foi de n=216, sendo n=72 por espécie estudada.

Figura 3 - Ensaio do acúmulo de rodamina *in vitro* na presença do sulfato de cádmio.



### 3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS:

Todos os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. O programa estatístico escolhido para as análises foi o SigmaPlot, fornecido pela SYSTAT, versão 11.0.

Inicialmente, todos os outliers das amostras foram retirados utilizando o método de amplitude interquantil (IQR - Interquartile Range) (MCALISTER, 1879). Em seguida, os valores foram transformados para  $10^5$  devido aos altos valores absolutos de fluorescência e para que ficasse mais claro a visualização dos resultados e dos valores nos gráficos.

Para a análise de autofluorescência e acúmulo de rodamina-B foi aplicada o teste *One Way ANOVA* com o nível de significância de  $p < 0,05$  para verificar a diferença entre os grupos. Para a análise do acúmulo de rodamina-B associado aos inibidores verapamil e o MK571, os valores foram transformados em valores relativos utilizando a média do acúmulo de rodamina-B na presença dos inibidores utilizados (verapamil e MK571) pela média do acúmulo de rodamina-B na ausência dos inibidores. Foi aplicado o teste-*t* com o nível de significância de  $p < 0,05$  para verificar a diferença entre o acúmulo de fluorescência na presença e na ausência dos inibidores para cada espécie estudada.

Para a análise dos efeitos do sulfato de cádmio, foi aplicado teste-*t* (nível de significância de  $p < 0,05$ ) para verificar a diferença entre grupos sem cádmio e os grupos com cádmio (ex: teste-*t* entre as amostras com rodamina-B e rodamina-B + cádmio), para cada espécie estudada.

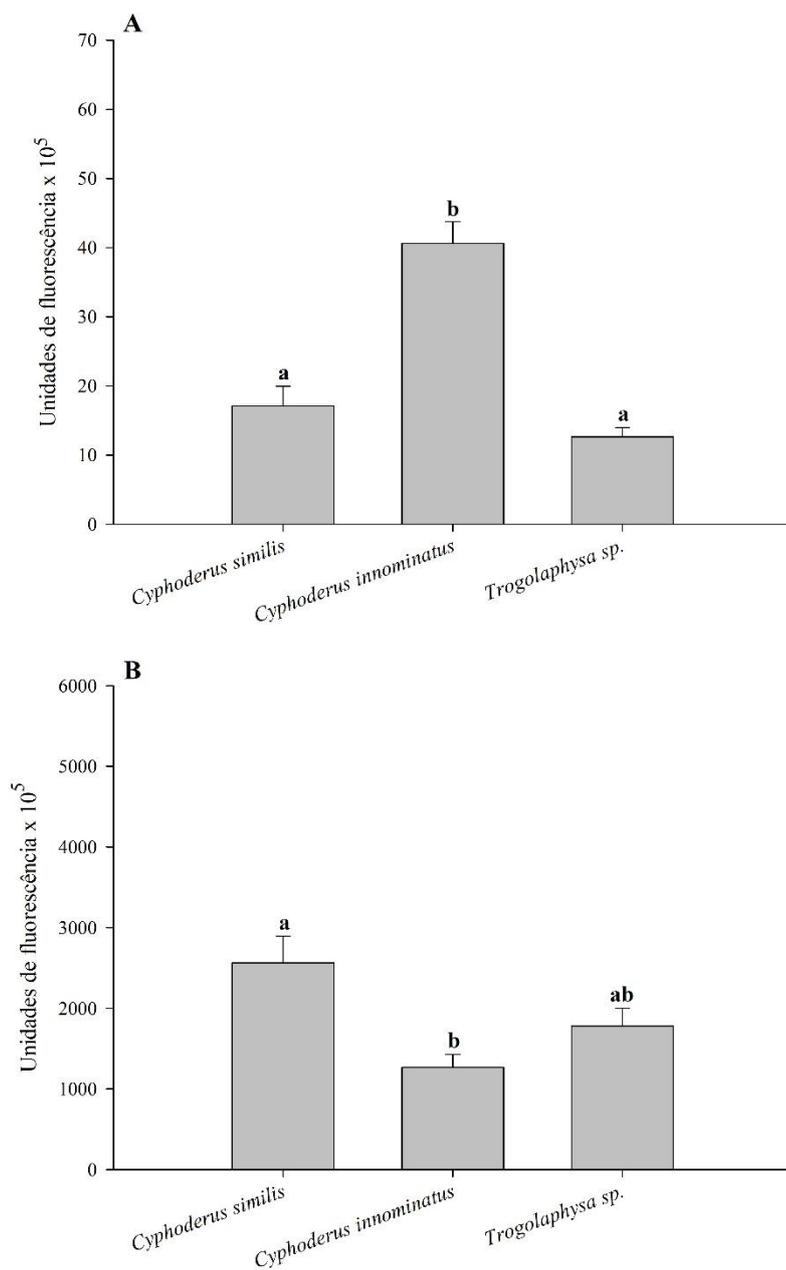
#### 4. RESULTADOS

A espécie *C. innominatus* apresentou uma autofluorescência ( $40 \pm 3,12$  unidades arbitrárias) maior em relação às outras duas espécies estudadas. O teste estatístico *One Way* ANOVA indicou que a autofluorescência de *C. innominatus* é diferente estatisticamente de *C. similis* ( $\cong 17 \pm 2,84$  unidades arbitrárias) e de *Trogolaphysa* sp. ( $\cong 13 \pm 1,29$  unidades arbitrárias). Estas duas tiveram suas autofluorescências consideradas não diferentes entre si do ponto de vista estatístico (Figura 4-A).

O ensaio do acúmulo de rodamina-B (Figura 4-B) pôde demonstrar a fluorescência acumulada pelo intestino de cada espécie. A espécie *C. similis* acumulou mais rodamina-B no tecido intestinal, identificado pela leitura de  $2600 \pm 333,57$  unidades arbitrárias de fluorescência (erro padrão de  $\pm 333,57$ ), seguido por  $1757 \pm 216,29$  unidades de fluorescência de *Trogolaphysa* sp. e  $1263 \pm 162,24$  de *C. innominatus*. O teste estatístico *One Way* ANOVA apontou que os valores do acúmulo do fluorescente rodamina-B são diferentes significativamente entre *C. similis* e *C. innominatus*.

Estes resultados indicam que o protocolo experimental foi efetivo para os objetivos do trabalho e que é possível detectar a quantidade de rodamina-B internalizada nas células intestinais de Collembola.

Figura 4 - Autofluorescência (A) e acúmulo de rodamina-B (B) em 3 espécies de Collembola. Letras diferentes indicam diferença estatística entre a autofluorescência emitida pelo intestino de cada espécie (A), e entre a fluorescência emitida pela rodamina acumulada no intestino de cada espécie (B) (*One Way ANOVA*,  $p < 0,05$ ,  $n = 24$ ).

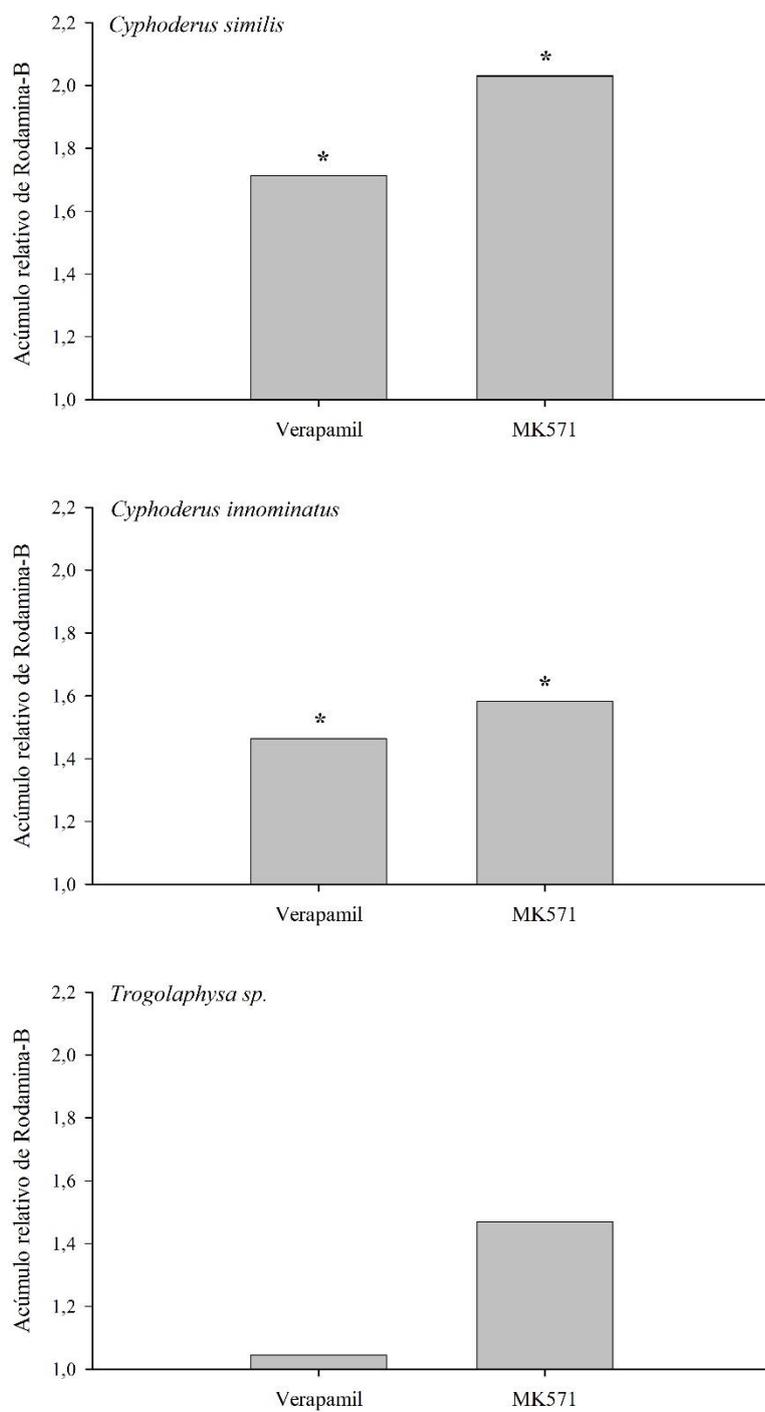


De acordo com a literatura, a inibição do mecanismo MXR através dos inibidores conhecidos levaria a um aumento do acúmulo da rodamina-B nas células. Nossos resultados mostraram que para a espécie *C. similis* o acúmulo de rodamina-B na presença dos inibidores foi de 1,7 vezes maior para o verapamil (teste-*t*  $p < 0,05$ ) e de 2,0 vezes maior para MK571 (teste-*t*  $p < 0,05$ ). (Figura 5).

O acúmulo de rodamina-B na presença dos inibidores foi de 1,4 e 1,5 vezes maior para verapamil e MK571, respectivamente (teste-*t*  $p < 0,05$ ) na espécie *C. innominatus* (Figura 5).

Em *Trogolaphysa* sp., o acúmulo de rodamina-B na presença do verapamil foi semelhante ao acúmulo na ausência do inibidor, já para o MK571, apesar do acúmulo de rodamina ter sido 1,4 vezes maior, não houve diferença estatística em relação ao acúmulo na ausência do inibidor (teste-*t*,  $p > 0,05$ ).

Figura 5 - Acúmulo relativo de rodamina-B na presença dos inibidores da P-gp. Os asteriscos indicam diferença estatística entre o acúmulo de rodamina na presença do inibidor e o acúmulo de rodamina na ausência do inibidor (teste  $t$ ,  $p < 0,05$   $n=24$ ).

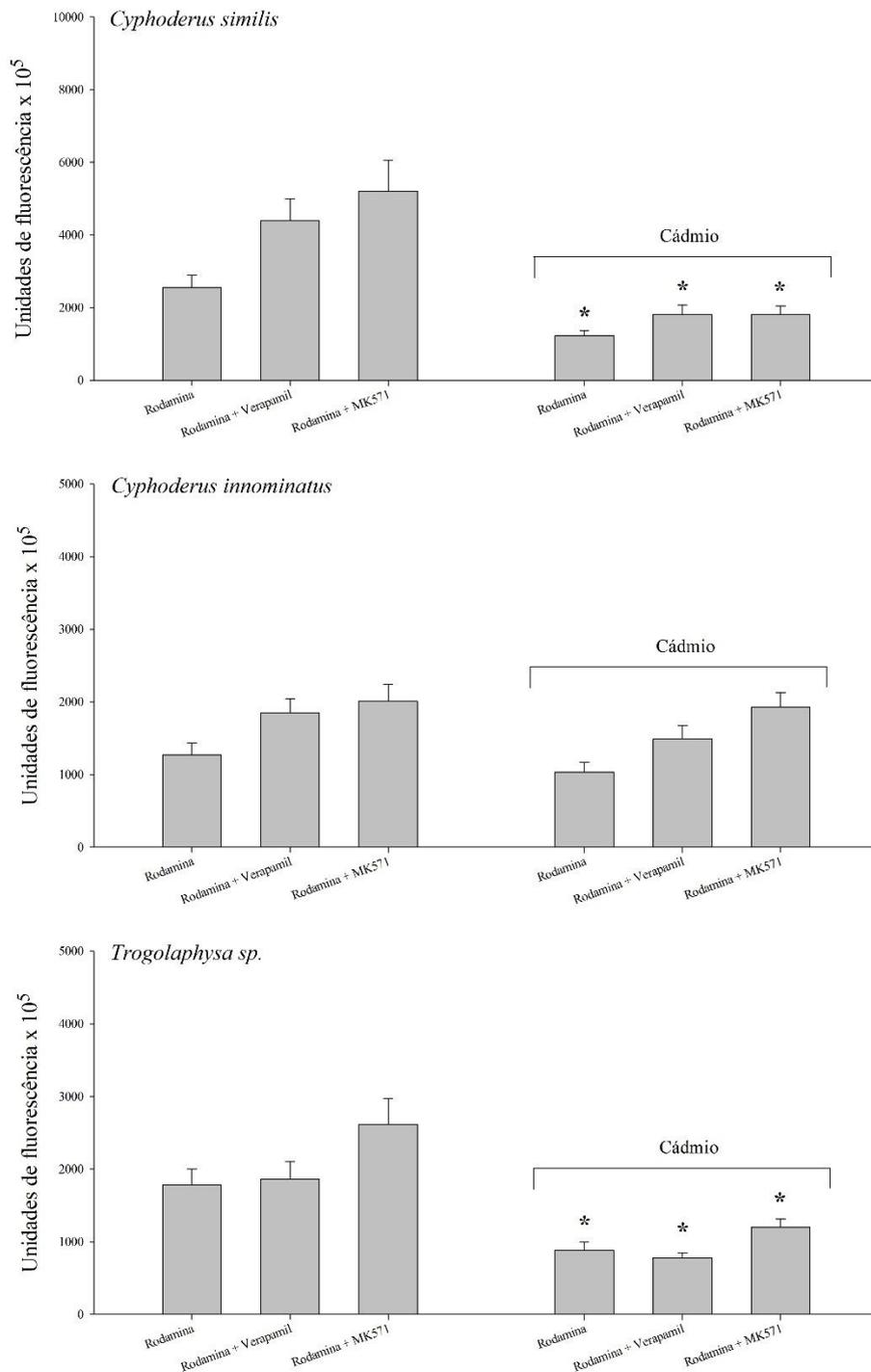


O ensaio do acúmulo de rodamina-B na presença dos inibidores e do sulfato de cádmio é um ensaio competitivo, pois ambos competem para ligar-se a proteína transmembranar. Neste ensaio (Figura 6) podemos inferir que para a espécie *C. similis*, quando o ensaio de acúmulo de rodamina-B foi realizado em co-exposição com o sulfato de cádmio, houve um menor acúmulo de rodamina em todas as condições experimentais (rodamina-B:  $2552 \pm 333,57$  na ausência de cádmio e  $1210 \pm 139,56$  na presença de cádmio, rodamina-B + verapamil:  $4386 \pm 606,70$  na ausência do cádmio e  $1824 \pm 258,40$  na presença de cádmio, rodamina-B + MK571:  $5198 \pm 855,67$  e  $1824 \pm 235,67$  na ausência e presença do cádmio, respectivamente teste-*t* ( $p < 0,05$ )).

Não houve diferença no acúmulo de rodamina-B durante o ensaio de co-exposição ao sulfato de cádmio para a espécie *C. innominatus* (rodamina-B:  $1267 \pm 162,24$  na ausência do cádmio e  $1037 \pm 134,52$  na presença do cádmio, rodamina-B + verapamil:  $1859 \pm 185,50$  na ausência do cádmio e  $1491 \pm 189,36$  na presença do cádmio, rodamina-B + MK571:  $2006 \pm 236,61$  na ausência do cádmio e  $1930 \pm 206,11$  na presença do cádmio) teste-*t* ( $p < 0,05$ )).

Em *Trogolaphysa* sp. houve um menor acúmulo de rodamina-B nas condições experimentais na presença do cádmio, assim como na espécie *C. similis* (rodamina-B:  $1780 \pm 216,29$  na ausência do cádmio e  $876 \pm 113,49$  na presença do cádmio, rodamina-B + verapamil:  $1858 \pm 241,43$  na ausência do cádmio e  $776 \pm 75,95$  na presença do cádmio, rodamina-B + MK571:  $2618 \pm 355,08$  e  $1196 \pm 113,88$  na ausência e presença do cádmio, respectivamente) teste-*t* ( $p < 0,05$ )).

Figura 6 - Ensaio do acúmulo da rodamina-B na presença dos inibidores e do sulfato de cádmio. Asteriscos indicam diferença estatística entre cada tratamento na ausência e presença de cádmio (teste t,  $p < 0,05$   $n=24$ ).



## 5. DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que cada espécie possui um valor único de autofluorescência e que ela, por sua vez, não interferiu nos demais testes desempenhados neste trabalho (Figura 1). A espécie *C. innominatus*, embora tenha apresentado uma maior autofluorescência (Figura 1-A), foi a espécie que menos acumulou rodamina-B (Figura 1-B), indicando uma maior atividade de bombas de efluxo nesta espécie, levando a acreditar que seu Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos (MXR) é mais eficiente em relação às outras espécies estudadas neste trabalho.

De acordo com os resultados obtidos, em *C. similis* e *Trogolaphysa* sp. pode-se inferir a presença dos transportadores P-gp e MRP no intestino dessas espécies (Figura 2), ambas bombas de efluxo envolvidas no mecanismo MXR. Tanto o verapamil, um conhecido inibidor da P-gp, quanto o MK571, um conhecido inibidor da MRP, foram eficientes em reduzir o efluxo de rodamina nestas espécies, o que foi evidenciado pelo maior acúmulo de rodamina quando esses inibidores estavam presentes. Este resultado reflete o fato de que o MRP pode complementar e suplementar o efluxo da P-gp devido a sobreposições de substratos entre os dois sistemas (LOE *et al.*, 1998; ROBSON *et al.*, 1998). Os dois inibidores utilizados funcionaram como inibidores do sistema MXR, tendo o MK571 apresentado valores de acúmulo de rodamina-B um pouco maiores quando comparado ao verapamil, embora diferença estatística entre o acúmulo gerado pelos dois inibidores não tenha sido identificada, assim como encontrado por Khangembam e colaboradores (2018) em seu trabalho analisando a capacidade de carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a resistência a um parasiticida, a ivermectina. Também, Torre e colaboradores (2014), observaram que o inibidor MK571 apresentou valores maiores de inibição quando utilizado, em comparação a ciclosporina, outro conhecido inibidor da P-gp.

Por intestino ser um amplo epitélio de trocas entre o meio interno e o meio externo do organismo, pode-se acreditar que este tecido necessite de uma grande barreira contra xenobióticos do meio externo advindos da alimentação. Estudos com fungos, que correspondem a base alimentar de Collembola, mostraram que estes podem ter a capacidade de bioacumular metais pesados, trabalhando principalmente, como filtros naturais de solos contaminados (HILDEBRANDT *et al.*, 2007; VERMA *et al.*, 2016; KAEWDOUNG *et al.*, 2016). Inclusive, foi bem documentado o potencial adaptativo de fungos em solos com presença de metais, incluindo o cádmio, foco do trabalho de Fazli

(2015). Dessa forma, parece natural que o intestino de Collembola possua um mecanismo responsável por evitar que poluentes advindos da alimentação entrem no organismo.

Neste trabalho, quando o cádmio foi administrado no intestino para analisar sua interação com o sistema MXR nas espécies de Collembola, exceto na espécie *C. innominatus*, as espécies acumularam menos rodamina-B na presença de cádmio (Figura 3). Isso demonstra uma maior atividade da P-gp e da MRP identificada pelo maior efluxo de rodamina. Embora o cádmio tenha estimulado o mecanismo MXR de *C. similis* e *Trogolaphysa* sp., em *C. innominatus* o cádmio pareceu não o alterar. Isto pode ser explicado pela baixa concentração experimental de sulfato de cádmio utilizada neste trabalho (1  $\mu$ M). Essa concentração pode não ter sido suficiente para a interferir na atividade das proteínas de defesa dessa espécie, uma vez que o mecanismo MXR de *C. innominatus* parece ser mais eficiente quando comparado com as outras espécies estudadas neste trabalho (Figura 3). Talvez, uma concentração mais alta do metal seja capaz de induzir o já aparente eficiente mecanismo MXR de *C. innominatus*.

Trabalhos utilizando outra espécie do gênero *Cyphoderus*, *C. javanus* (SAHA & JOY, 2014; SAHANA *et al.*, 2014; SAHANA & JOY, 2016), analisaram a taxa de mortalidade e reprodução da espécie em solos com presença de metais pesados, herbicidas e pesticidas, e foi comprovado que em quantidades subletais desses poluentes, a espécie conseguiu sobreviver e reproduzir-se. Isso pode inferir que, espécies do gênero *Cyphoderus* podem ter capacidade de sobreviver em ambientes com solos contaminados por possuírem mecanismos de defesa, como o sistema MXR. De acordo com o Catálogo de espécies de Collembola depositado na Coleção de Referência de Fauna do Solo (CRFS-UEPB-Brasil) (BRITO *et al.*, 2017), espécies do gênero *Cyphoderus* (*C. agnotus*, *C. arlei*, *C. caetetus*, *C. innominatus* e *C. similis*) ocorrem em ambientes de floresta, praias e cavernas, sendo o último, o mais comum.

Ambientes cavernícolas são caracterizados por uma falta permanente de luz (POULSON & WHITE, 1969; CULVER, 1982). Na ausência de organismos fotoautotróficos, os animais devem buscar outras fontes de recursos que geralmente são escassos. Esses recursos são principalmente matéria orgânica importada para cavernas por água, gravidade, ou excrementos de animais ou sua decomposição (HERRERA, 1995; FERREIRA, 1998). As intensas atividades de mineração de Minas Gerais, ambientes com grande ocorrência de espécies do gênero *Cyphoderus* para o Brasil, descartam toneladas de resíduos ao ar livre, na água, em sedimentos e no solo. Consideráveis concentrações

de metais pesados e elementos tóxicos se acumulam e penetram no solo, nas águas subterrâneas e nos rios (VEADO *et al.*, 2002). Sabendo disso, para a sobrevivência das espécies, seria imprescindível que estas possuíssem algum sistema para eliminação destes potenciais xenobióticos, ao contrário, não seriam encontradas em grandes quantidades nestes ambientes. De acordo com Leppard (1983), os resíduos industriais da mineração, indústrias químicas e processamento de metais são a principal fonte de poluição do solo, porque contém uma grande variedade de metais pesados. O meio ambiente tem sido contaminado com vários metais dos resíduos da mina, como materiais agrícolas e fertilizantes (Cd, Zn, V), pesticidas (As, Pb, Zn) e conservantes de madeira (As), corrosão do metal (Zn, Cd), por indústrias metalúrgicas (Ni, Si, Mn, Ag, As, Sb, etc.) e de outras fontes, como pigmentos e tintas, aditivos, lubrificantes e medicamentos (LEPPARD, 1983), o que reforça o fato da espécie *C. similis* poder ter uma grande capacidade de eliminação de metais pesados através do seu refinado mecanismo MXR.

A interação entre cádmio e os transportadores P-gp e MRP foram analisadas em outros grupos animais. Torre e colaboradores (2014), analisando os efeitos do cádmio em brânquias e hemócitos do molusco bivalve *Mytilus galloprovincialis*, sugerem que o cádmio seja um substrato competitivo para os inibidores conhecidos, tanto da P-gp quanto da MRP. Em ensaios *in vitro* de pré-exposição, (exposição ao cádmio por um tempo determinado, lavagem seguida de ensaio de acúmulo da rodamina) e co-exposição (ensaio de acúmulo de rodamina na presença do metal) ao cádmio, indicam que há uma indução diferencial do mecanismo. No ensaio de pré-exposição, houve uma diminuição no acúmulo do fluorescente, o que indica que a pré-exposição ao metal aumenta a expressão gênica dos transportadores. Já no ensaio de co-exposição, o metal aumentou o acúmulo do fluorescente rodamina, sugerindo que os transportadores trabalharam no efluxo de cádmio, competindo com a rodamina. No presente trabalho, o ensaio *in vitro* de co-exposição ao metal (Figura 3), houve diminuição do acúmulo da rodamina-B na presença de cádmio, exceto para *C. innominatus*, diferente do observado por Torre e colaboradores (2014). Esse resultado pode ser explicado pelas distinções na regulação da transcrição gênica ou diferentes especificidades do substrato entre os genes que compõem o mecanismo para cada espécie (TORRE *et al.*, 2012). Em um estudo com células branquiais de ostras, o cádmio aumentou a atividade de efluxo de rodamina-B em cerca de 3 a 5-7 vezes, resultado em um aumento de 2 a 2,5 vezes na expressão da P-gp, o que reforça o fato da P-gp em contribuir para a resistência a este metal em ostras (*Crassostrea*

*virginica*) (IVANINA & SOKOLOVA, 2008). O mesmo foi visto por Callaghan e Denny (2002), demonstrando que a P-gp têm papel na regulação da toxicidade ao cádmio em *Drosophila*. Todos esses estudos reforçam que a expressão da P-gp pode ser uma resposta protetora contra a exposição ao cádmio em uma variedade de organismos.

Ainda, os transportadores MRPs podem desempenhar um papel crítico na conversão de células normais em células resistentes ao cádmio, como supõe Oh e colaboradores (2009) em seu trabalho analisando o papel do cádmio na alteração de células humanas, reforçando os resultados similares nos ensaios na ausência do metal e na co-exposição a ele, para a espécie *C. innominatus* (Figura 3).

Sabendo que o sítio de ligação do nucleotídeo citosólico das proteínas ABC serem altamente conservados entre as classes, podemos explicar a sua atuação em vários clados (VEHNIÄINEN & KUKKONEN, 2014). Em artrópodes, sabe-se que a desintoxicação metabólica é o principal mecanismo de defesa contra uma ampla gama de substratos (FEYEREISEN, 2005; OAKESHOTT *et al.*, 2005; RANSON & HEMINGWAY, 2005). Alguns trabalhos foram feitos buscando a ocorrência da proteína P-gp neste grande grupo. O aumento nas concentrações de químicos como vimblastina e nicotina com o uso do verapamil como inibidor da P-gp, mostraram que inseticidas atuam como substratos para a P-gp, uma vez que proteínas similares foram encontradas nas ordens Diptera (*Chironomus riparius*) e Lepidoptera (*Manduca sexta* (L.)) (GAERTNER *et al.*, 1998; PODSIADLOWSKI *et al.*, 1998), além da confirmação da P-gp em tecidos larvais utilizando o método de imunohistoquímica (PODSIADLOWSKI *et al.*, 1998), tendo sido comprovado por Porreta e colaboradores (2008), utilizando o mosquito *Aedes caspius* como ferramenta. Leader e O'Donnell (2005), identificaram a presença da P-gp através substratos fluorescentes, como rodamina-B, nos túbulos de malpighi de dois insetos, a mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) e uma espécie de grilo (*Teleogryllus commodus*). Em 2018, Khangembam e colaboradores testaram a capacidade de carrapatos (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) a resistirem a um parasiticida por meio da P-gp, com resultados satisfatórios. Dessa forma, podemos inferir que os artrópodes tem um refinado mecanismo para a eliminação de potenciais xenobióticos, como pesticidas, químicos e metais pesados.

Trabalhos foram feitos buscando explicar a capacidade de artrópodes em atividades de efluxo na eliminação de xenobióticos das células através do Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos (MXR). Vehniäinen e Kukkonen (2014) detectaram

transcritos ABCB e ABCC, que indicam a presença de proteínas transportadoras sendo expressas em células de *Daphnia magna* (Daphniidae, Branchiopoda), porém ao analisarem a atividade do sistema não encontraram efeito inibitório para o acúmulo de rodamina-B quando verapamil ou MK571 foram utilizados. Porreta e colaboradores (2008) encontraram um aumento significativo na toxicidade de inseticidas (em concentrações subletais) na presença de verapamil na espécie *Ochlerotatus (Aedes) caspius* (Diptera: Culicidae), indicando o envolvimento da P-gp na defesa contra estes compostos. Foi encontrado um aumento significativo na expressão da P-gp em populações de larvas da lagarta do tabaco (*Heliothis virescens*) com o uso de pesticidas para induzir o mecanismo, sugerindo o potencial envolvimento da P-gp na resistência a pesticidas (LANNING *et al.*, 1996). Veché e colaboradores (2006), perceberam a expressão aumentada de P-gp em resposta a poluentes como PAHs, levantando a atuação da P-gp como um sistema de desintoxicação de poluentes em *Drosophila*, ainda, que o aumento da resistência elevada a inseticidas, como o ABM, está relacionada ao aumento da expressão de P-gp, contribuindo para a desintoxicação a estes químicos (LUO *et al.*, 2013).

No atual trabalho, identificamos pela primeira vez a atividade de bombas de efluxo no intestino de três espécies de Collembola (*C. similis*, *C. innominatus* e *Trogolaphysa* sp.), sendo estas bombas a base do Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos (MXR). Encontramos ainda que, em duas espécies (*T. goiana* e *C. similis*) respondem à uma concentração muito baixa de cádmio, um metal pesado amplamente encontrado em solos contaminados.

## 6. CONCLUSÕES

- a) Há indícios de bombas de efluxo, indicando atividade do Mecanismo de Resistência à Multixenobióticos (MXR) nas três espécies de Collembola (*Trogolaphysa* sp., *C. similis* e *C. innominatus*);
- b) Os dois inibidores utilizados no trabalho foram efetivos para inibição do mecanismo nas espécies do gênero *Cyphoderus*;
- c) Para as espécies *Trogolaphysa* sp. e *C. similis*, o cádmio induziu uma maior atividade do mecanismo MXR, mesmo utilizado em uma baixa concentração (1  $\mu\text{M}$ );
- d) Uma baixa concentração de cádmio não influenciou na atividade do mecanismo em *C. innominatus*, espécie que apresentou maior atividade do mecanismo na ausência do metal, levando a acreditar que o mecanismo nesta espécie seja mais refinado em relação as demais;
- e) O trabalho pode ser usado para diversas aplicabilidades visando a análise de solos brasileiros, utilizando um grupo amplamente distribuído em todo o território nacional, a classe Collembola, e o MXR como mecanismo de resposta fisiológica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, E. A.; BELLINI, B. C.; BERNARDO, A. N.; FERNANDES, L. H.; MENDONÇA, M. C.; OLIVEIRA, E. P.; QUEIROZ, G. C.; SAUTTER, K. D.; SILVEIRA, T. C.; ZEPPELINI, D. 2012. Errata Corrigenda and update for the "Synthesis of Collembola: an update to the species list". ABRANTES *et al.*, 2010. *Zootaxa*, v. 2388, p. 1-22. 2010.

ARLÉ, R. & GUIMARÃES, A. E. Nova espécie do gênero *Paronella* Schött, 1893 do Rio de Janeiro (Collembola). *Rev. Bras. Entomol.*, v. 23, p. 213-217. 1979.

ARLÉ, R. Novas espécies de Pseudachorutini (Collembola) do Rio de Janeiro e arredores. *Bol. Biol.*, v. 4, p. 67-72. 1939.

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

BELLINGER, P. F. A new family of Collembola (Arthropoda, Tracheata). *Caribb. J. Sci.*, v. 21, p. 117-123. 1985.

BELLINGER, P. F.; CHRISTIANSEN, K. A.; JANSSENS, F. Checklist of the Collembola of the World. Disponível em: <<http://www.collembola.org>>, acesso em 14/01/2016.

BELLINI, B. C. & CIPOLA, N. G. The Neotropical genera of Paronellinae (Collembola, Entomobryoidea, Paronellidae) with description of two new species and redescription of *Campylothorax mitrai*. *Zootaxa*, v. 4300, p. 151-179. 2017.

BÖRNER, C. Das System der Collembolen nebst Beschreibung neuer Collembolen des Hamburger Naturhistorischen Museums. *Mitteilungen aus dem Naturhistorischen Museum in Hamburg*. XIII. Jahrgang, 2. Beiheft zum Jahrbuch der Hamburgischen Wissenschaftlichen Anstalten, Hamburg, v. 23, p. 147-188. 1906.

BOŠNJAK, I.; BIELEN, A.; BABIĆ, S.; SVER, L.; POPOVIĆ, N. T.; STRUNJAK-PEROVIĆ, I.; COŽ-RAKOVAC, R.; KLOBUČAR, R. S. First evidence of the P-glycoprotein gene expression and multixenobiotic resistance modulation in earthworm. *Arh Hig Rada Toksikol*, v. 65, p. 67-75. 2014.

BOUCHÉ, M. B. *Lombriciens de France. Écologie et Systématique*. I.N.R.A. Publ. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, v. 72, 671 p. 1972.

- BRETFELD, G. Symphypleona. In: W. Dunger (ed.): Synopses on Palaearctic Collembola, v. 2. Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz, Görlitz, v. 71, 318 p. 1999.
- BRITO, R. A.; LIMA, E. C. A.; FERREIRA, A. S.; OLIVEIRA, J. V. L. C.; AMORIM, T. P. L.; MACHADO, T. G.; LOPES, B. C. H.; COSTA, I. A.; ALVES, J. L. S.; BRITO, N. P.; ZEPPELINI, D. A Catalogue of Species of Collembola (Hexapoda: Ellipura) Deposited in Coleção de Referência de Fauna de Solo of the Universidade Estadual da Paraíba, Brazil. Fla. Entomol., v. 100, p. 9-14. 2017.
- CALLAGHAN, A & DENNY, N. Evidence for an Interaction between p-glycoprotein and cadmium toxicity in cadmium resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. Ecotoxicol. Environ. Saf., v. 52, p. 211-213. 2002.
- CASSAGNAU, P. Collemboles d'Amérique du Sud, II. Orchesellini, Paronellinae, Cyphoderinae. Biologie de la Amérique Australe, v. 2, p. 127-148. 1963.
- CHRISTIANSEN, K. A. Bionomics of Collembola. Annu. Rev. of Entomol., v. 9, p. 147-178. 1964.
- CROUAEU, Y.; GISCLARD, C.; PEROTTI, P. The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) in bioassays of waste. Appl. Soil Ecol., v. 19, p. 65-70. 2002.
- CULVER, D. C. Cave Life. Evolution and ecology. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts and London, England, 189 p. 1982.
- CZARNETZKI, A. B. & TEBBE, C. C. Diversity of bacteria associated with Collembola - a cultivation-independent survey based on PCR-amplified 16S rRNA genes. FEMS Microbiol. Ecol., v. 49, p. 217-227. 2004.
- DEHARVENG, L. Soil Collembola diversity, endemism, and reforestation: A case study in the Pyrenées (France). Biodivers. Conserv., v. 10, n. 1, p. 74-84. 1996.
- FAVA, F. & BERTIN, L. Use of exogenous specialised bacteria in the biological detoxification of a dump site polychlorobiphenyl contaminated soil in slurry phase conditions. Biotechnol. Bioeng., v. 64, p. 240-249. 1999.
- FAVA, F. & PICCOLO, A. Effects of humic substances on the bioavailability and aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in a model soil. Biotechnol. Bioeng., v. 77, p. 204-211. 2001.

- FAZLI, M. M.; SOLEIMANI, N.; MEHRASBI, M.; DARABIAN, S.; MOHAMMADI, J.; RAMAZANI, A. Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. *J Environ. Health Sci. Eng.*, v. 19, p. 1-9. 2015.
- FERREIRA, R. L. Ecologia de comunidades cavernícolas associadas a depósitos de guano de morcegos. Dissertação de Mestrado, UFMG, Belo Horizonte, 85 p. 1998.
- FEYEREISEN, R. Insect cytochrome P450. *Comprehensive Molecular Insect Science – Biochem. Mol. Biol.*, v. 4, p. 1-77. 2005.
- FIERA, C. Biodiversity of Collembola in urban soils and their use as bioindicators for pollution. *Pesq. agropec. bras.*, v. 44, n. 8, p. 868-873. 2009.
- FOLSOM, J. W. Insects of the subclass Apterygota from Central America and the West Indies. *Proceedings of the United States National Museum*, v. 2701, p. 1-16. 1927.
- FOUNTAIN, M. T. & HOPKIN, S. P. A Comparative study of the effects of metal contamination on Collembola in the field and in the laboratory. *Ecotoxicol.*, v. 13, p. 573-587. 2004.
- FREITAS, A. V. L.; FRANCINI, R. B.; BROWN JR, K. S. Insetos como indicadores ambientais. In: CULLEN JR., L.; RUDRAN, R.; VALADARES-PADUA, C. Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida. Curitiba: UFPR, p. 125-151. 2004.
- FRISCHE, T. Ecotoxicological evaluation of in situ bioremediation of soils contaminated by the explosive 2,4,6- trinitrotoluene (TNT). *Environ. Pollut.*, v. 121, p. 103-113. 2003.
- GAERTNER, L. S.; MURRAY, C. L.; MORRIS, C. E. Transepithelial transport of nicotine and vinblastine in isolated malpighian tubules of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) suggests a P-glycoproteinlike mechanism. *J. Exp. Biol.*, v. 201, p. 2637-2645. 1998.
- GEJLSBERG, B.; KLINGE, C.; SAMSOEPETERSEN, L.; MADSEN, T. Toxicity of linear alkylbenzene sulfonates and nonylphenol in sludge-amended soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 20, p. 2709-2716. 2001.
- GERMANN, U. A. Molecular analysis of the multidrug transporter. *Cytotechnology*, v. 12, p. 33-62. 1993.

- GREENSLADE, P. & VAUGHAN, G. T. A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. *Pedobiologia*, v. 47, p. 171-179. 2003.
- GREENSLADE, P. J. Collembola. The insects on Australia. A textbook for students and research workers. CSIRO, Carlton, Australia: Melbourne University Press, ed. 2th, 252-264 p. 1991.
- GUIMARÃES, B.; BADOW, C. AMORIM, M. J. B., KEHRER, A.; COORSA, A. Mixture toxicity assessment of a biocidal product based on reproduction and avoidance behaviour of the collembolan *Folsomia candida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 165, p. 284-290. 2018.
- HACKENBERGER, B. K.; VELKI, M.; STEPIĆ, S.; HACKENBERGER, D. K. First evidence for the presence of efflux pump in the earthworm *Eisenia andrei*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 75, p. 40-45. 2012.
- HANDSCHIN, E. Neue myrmecophile und termitophile Collembolenformen aus Süd-Amerika. *Neue Beiträge zur systematischen Insektenkunde*, v. 3, p. 13-28. 1924.
- HERRERA, F. F. Las comunidades de artropodos del guano del guácharos en la cueva del guácharo, Venezuela. *Bol. Soc. Venez. Espeleol.*, v. 29, p. 39-46. 1995.
- HILDEBRANDT, U.; REGVAR, M.; BOTHE, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, v. 68, p. 139-146. 2007.
- HOLLAND, I. B.; COLE, S. P. C.; KUCHLER, K.; HIGGINS, C. F. ABC proteins: from bacteria to man. Academic press: London, ed. 1, 530 p. 2003.
- ISO. 1999. Soil quality-inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. Rep. No. ISO 11267:1999(E). Geneva: Int. Stand. Organ. 16 pp.
- IVANINA, A. N. & SOKOLOVA, I. M. Effects of cadmium exposure on expression and activity of P-glycoprotein in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquat. Toxicol.*, v. 88, p. 19-28. 2008.
- JEONG, C.; KIM, H.; KANG, H.; LEE, J. ATP-binding cassette (ABC) proteins in aquatic invertebrates: Evolutionary significance and application in marine ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.*, v. 185, p. 29-39. 2017.

JORDANA, R., ARBEA, J. I., SIMÓN, C., LUCÍAÑEZ, M. J. Collembola, Poduromorpha. In: RAMOS, M. A (Ed.) Fauna Ibérica, Museo nacional de Ciências Naturales. Madrid, CSIC, v. 8, 807 p. 1997.

JUVONEN, R.; MARTIKAINEN, E.; SCHULTZ, E.; JOUTTI, A.; AHTIAINEN, J.; LEHTOKARI, M. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 47, p. 156-66. 2000.

KAEWDOUNG, B.; SUTJARITVORAKUL, T.; GADD, G. M.; WHALLEY, A. J. S.; SIHANONTH, P. Heavy metal tolerance and biotransformation of toxic metal compounds by new isolates of Wood-Rotting Fungi from Thailand. *Geomicrobiol. J.*, v. 33, p. 283-288. 2016.

KATZUNG, B. G.; MARTERS, S. B.; TREVOR, A. J. *Farmacologia básica e clínica*. 12<sup>a</sup> Ed., 1242 p. 2014.

KHANGEMBAM, R.; SINGH, H.; JYOTI; RATH, S. S.; SINGH, N. K. Effect of synergists on ivermectin resistance in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Punjab districts, India. *Ticks and Tick-borne Dis.*, v. 9, p. 682-686. 2018.

KRATZ, W. & RIESBECK, F. The effect of explosives in soil of a military scrap heap on population development of *Folsomia candida* (Willem 1902) (Collembola, Insecta). *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, v. 10, p. 143-146. 1998.

KRISTENSEN, N. P. Phylogeny of insect orders. *Annual Review of Entomology*, v. 26, p. 135–157. 1981.

KUPERMAN, R. G.; CHECKAI, R. T.; SIMINI, M.; PHILLIPS, C. T. Manganese toxicity in soil for *Eisenia fetida*, *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta), and *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 57, p. 48-53. 2004.

KURELEC, B. Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. *Sci. Total Environ.*, v. 171, p. 197-204. 1995.

KURELEC, B.; SMITAL, T.; PIVÈVIÆ, B.; EUFEMIA, N.; EPEL, D. Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers. *Ecotoxicology*, v. 9, n. 5, p. 307-327. 2000.

LANNING, C. L.; FINE, R. L.; CORCORAN, J. J.; AYAD, H. M.; ROSE, R. L.; ABOU-DORIA, M. B. Tobacco budworm P-glycoprotein: biochemical characterization and its involvement in pesticide resistance. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1291, p. 155-162. 1996.

- LEADER, J. P. & O'DONNELL, M. J. Transepithelial transport of fluorescent p-glycoprotein and MRP2 substrates by insect Malpighian tubules: confocal microscopic analysis of secreted fluid droplets. *J. Experiment. Bio.*, v. 208, p. 4363-4376. 2005.
- LEE, Y. H.; KANG, H.; KIM, M.; LEE, J. JEONG, C. The protective role of multixenobiotic resistance (MXR)-mediated ATP-binding cassette (ABC) transporters in biocides-exposed rotifer *Brachionus koreanus*. *Aquat. Toxicol.*, v. 195, p. 129-136. 2018.
- LEPPARD, G. G. Trace Element Speciation in Surface Waters and Its Ecological Implication. Plenum Press, New York, 352p. 1983.
- LICHT, A. & SCHNEIDER, E. ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Cent. Eur. J. Biol.*, v. 6, p. 785-801. 2011.
- LIU, M.; XU, J.; KROGH, P. H.; SONG, J.; WU, L.; LUO, Y.; KE, X. Assessment of toxicity of heavy metal-contaminated soils toward *Collembola* in the paddy fields supported by laboratory tests. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v. 25, p. 16969-16978. 2018.
- LOE, D.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Characterization of vincristine transport by the Mr 190 000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res.*, v. 58, p. 5130-5136. 1998.
- LUBBOCK, J. Monograph of the *Collembola* and *Thysanura*. London. 1873.
- LÜDERS, A.; 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. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 150, p. 368-371. 2009.
- LUO, L.; SUN, Y.; WU, Y. Abamectin resistance in *Drosophila* is related to increased expression of P-glycoprotein via the dEGFR and dAkt pathways. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 43, p. 627-634. 2013.
- MANH VU, Q.; NGUYEN, T. T. Microarthropod community structures (*Oribatei* and *Collembola*) in Tam Dao National Park, Vietnam. *J Biosci*, v. 25, n. 4, p. 379-386. 2000.
- MCALISTER, D. The Law of the Geometric Mean. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 29, p. 367-376. 1879.
- MILLS, H. B. *Collembola* from Yucatan Caves. In: Pearse, A. S. (Ed.), *Fauna of Yucatan Caves*, Carnegie Institution of Washington Publication, v. 491, p.183-190. 1938.

- MINIER, C.; BORGHI, V.; MOORE, M. N.; PORTE, C. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, v. 50, p. 167-176. 2000.
- NICOLET, H. Recherches pour servir á l'Histoire des Podurelles. *Nouvelles Mémoires de la Société Helvetica Scientiae Naturalis*, v. 6, p. 1-88. 1942.
- NUNES, R. C. & BELLINI, B. C. Three new species of Entomobryoidea (Collembola: Entomobryomorpha) from Brazilian Caatinga-Cerrado transition, with identification keys to Brazilian *Cyphoderus*, *Pseudosinella* and *Trogolaphysa* species. *Zootaxa*, v. 4420, p. 71-96. 2018.
- OAKESHOTT, J. G.; CLAUDIANOS, C.; CAMPBELL, P. M.; NEWCOMB, R. D.; RUSSELL, R. J. Biochemical genetics and genomics of insect esterases *Comprehensive Molecular Insect Science - Pharmacology*, v. 5, p. 309-381. 2005.
- OH, S. H.; LEE, S. Y.; CHOI, C. H.; LEE, S. H.; LIM, S. C. Cadmium adaptation is regulated by multidrug resistance-associated protein-mediated Akt pathway and metallothionein induction. *Arch. Pharm. Res.*, v. 32, p. 883–891. 2009.
- OLIVEIRA FILHO, L. C.; BARETTA, D.; ZORTÉA, T.; OLIVEIRA, J. P. M.; SANTOS, J. C. P. Resíduo piritoso provoca toxicidade aguda e crônica em *Collembola* e *Oligochaeta*. *Rev. Scientia Agraria*, v. 18, n. 1, p. 64-75. 2017.
- PALACIOS-VARGAS, J. G., CUTZ, L. Q., Y C MALDONADO. Redescription of the male of *Coenaletes caribaeus* (Collembola: Coenaletidae) associated with hermit crabs (Decapoda; Coenobitidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 93, p. 194-197. 2000.
- PODSIADŁOWSKI, L.; MATHA, V.; VILCINSKAS, A. Detection of a P-glycoprotein related pump in *Chironomus* larvae and its inhibition by verapamil and cyclosporin A. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, v. 121, p. 443-450. 1998.
- PORRETA, D.; GARGANI, M.; BELLINI, R.; MEDICI, A.; PUNELLI, F.; URBANELLI, S. Defence mechanisms against insecticides temephos and diflubenzuron in the mosquito *Aedes caspius*: the P-glycoprotein efflux pumps. *Med. Vet. Entomol.*, v. 22, p. 48-54. 2008.
- POULSON, T. L. & WHITE, W. B. The cave environment. *Science*, v. 165, p. 971-981. 1969.

- RANSON, H. & HEMINGWAY, J. Glutathione transferases. *Comprehensive Molecular Insect Science - Pharmacology*, v. 5, p 383-402. 2005.
- REEH, J.; JEONG, C.; KIM, B.; LEE, J. P-glycoprotein (P-gp) in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*: Molecular characterization and expression in response to pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.*, v. 114-115, p. 104-118. 2012.
- ROBSON, C.; WRIGHT, K. A.; TWENTYMAN, P. R.; LAMBERT, P. A.; GRIFFIN, R. J. Chemical synthesis and biological properties of novel fluorescent antifolates in Pgp- and MRPOverexpressing tumor cell lines. *Biochem. Pharmacol*, v. 56, p. 807-816. 1998.
- SAHA, I & JOY, V. C. Potential ill effects of igr pesticides on life-history parameters in ecologically important soil Collembola *Cyphoderus javanus* Börner. *Int. J Sci., Environ. Technol.*, v. 3, p. 365-373. 2014.
- SAHANA, A. & JOY, V. C. Short-term biochemical ill effects of insect growth regulator (IGR) pesticides in *Cyphoderus javanus* Börner (Collembola: Insecta) as potential biomarkers of soil pollution. *Environ. Monit. Assess.*, v. 7, n. 1, 2016.
- SAHANA, A. & JOY, V. C. Short-term biochemical impacts in *Cyphoderus javanus* Börner (Collembola) as potential biomarkers of fly ash and heavy metal pollution in tropical lateritic soil. *J Environ. Prot.*, v. 7, p. 1-13. 2016.
- SAHANA, A.; AGARWAL, S.; BHATTACHARYA, S.; CHACKO, J. V. Short-term oxidative stress responses in *Cyphoderus javanus* Börner (collembola), as biomarkers of heavy metal pollution in lateritic soil. *Poll Res.*, v. 33, p. 201-206. 2014.
- SAVIGNY, J. C. Analyse d'un memoire sur les Lombrics par Cuvier. *Mem. Acad. Sci. Inst. France.*, v. 5 p. 176-184. 1826.
- SCHÄFER, R. & ACHAZI, R. K. The toxicity of soil samples containing TNT and other ammunition derived compounds in the enchytraeid and Collembola-biotest. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, v. 6, p. 213-9. 1999.
- SILLAPAWATTANA, P. & SCHÄFFER, A. Effects of imidacloprid on detoxifying enzyme glutathione S-transferase on *Folsomia candida* (Collembola). *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v. 24, p. 11111-11119. 2017.
- SILVA, D. D. & BELLINI, B. C. *Trogolaphysa formosensis* sp. nov. (Collembola: Paronellidae) from Atlantic Forest, Northeast Region of Brazil. *Zoologia*, v. 32, p. 53-58. 2015.

- SMITAL, T. & KURELEC, B. The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. *Mutat. Res.*, v. 399, p. 43-53. 1998.
- SOTO-ADAMES, F. N.; BARRA, J. A.; CHRISTIANSEN, K.; JORDANA, R. Suprageneric Classification of Collembola Entomobryomorpha. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 101, p. 501-513. 2008.
- STEIN, W. D. Kinetics of the multidrug transporter (P-glycoprotein) and its reversal. *Physiol. Rev.*, v. 77, p. 545-590. 1997.
- STORK, N. E. & EGGLETON, P. Invertebrates as determinants and indicators of soil quality. *Am. J. Alt. Agric.*, v. 7, pp. 23-32. 1992.
- 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 Discov. Today*, v. 13, p. 9-10. 2008.
- 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. *Mar. Environ. Res.*, v. 93, p. 56-63. 2014.
- TORRE, C. D.; ZAJA, R.; LONCAR, J.; SMITAL, T.; FOCARDI, S.; CORSI, I. Interaction of ABC transport proteins with toxic metals at the level of gene and transport activity in the PLHC-1 fish cell line. *Chem. Biol. Interact.*, v. 198, p. 9-17. 2012.
- VACHÉ, C.; CAMARES, O.; DE GRAEVE, F.; DASTRUGUE, B.; MEINIEL, A.; VAURY, C.; PELLIER, S.; LEOZ-GARZIANDIA, E.; BAMDAD, M. *Drosophila melanogaster* P-Glycoprotein: A membrane detoxification system toward polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 25, p. 572-580. 2006.
- VAN GESTEL, C. A. M. & HENSBERGEN, P. J. Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 16, p. 1177-1186. 1997.
- VAN GESTEL, C. A.; WAARDE, J. J. V.; DERKSEN, J. G. M.; HOEK, E. E. V.; VEUL, M. F. X. W.; BOUWENS, S.; RUSCH, B.; KRONENBURG, R.; STOKMAN, G. N. M. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 20, p. 1438-1449. 2001.

- VAN GESTEL, C. M. A. & VAN DIEPEN, A. M. F. The Influence of Soil Moisture Content on the Bioavailability and Toxicity of Cadmium for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 36, p. 123-132. 1997.
- VAN STRAALLEN, N. M.; SCHOBEN, J. H. M.; GOEDE, R. G. M. Population Consequences of Cadmium Toxicity in Soil Microarthropods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 17, p.190-204. 1989.
- VEADO, M. A. R. V.; AVELAR, A. C.; VEADO, J. C. C.; MENEZES, M. A. B. C.; DE OLIVEIRA, A. H.; MIGUEL, R. A. Inaa as a tool for environment biomonitoring. *Rev. Bras. Pesp. Desenvol.*, v. 4, p. 994-998. 2002.
- VEHNIÄINEN, E. & KUKKONEN, J. V. K. Multixenobiotic resistance efflux activity in *Daphnia magna* and *Lumbriculus variegatus*. *Chemosphere*, v. 124, p. 143-149. 2014.
- VELKI, M. & HACKENBERGER, B. K. Species-specific differences in biomarker responses in two ecologically different earthworms exposed to the insecticide dimethoate. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 156, p. 104-112. 2012.
- VERMA, J.; BHATT, A.; AGRAWAL, P. K. In-vitro study on bioaccumulation and tolerance of heavy metals by endophytic fungi *alternaria alternata* isolated from *cupressus torulosa* d.don. *Oct. Jour. Env. Res.*, v. 4, p. 146-154. 2016.
- YOSHII, R. Paronellid Collembola from caves of Central and South America collected by P. Strinati. *Rev. Suisse Zool.*, v. 95, p. 449-459. 1988.
- ZAJA, R.; KLOBUCAR, R. S.; SMITAL, T. Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Aquat. Toxicol.*, v. 81, p. 365-376. 2007.
- ZEPPELINI, D. & BELLINI, B. C. Introdução ao estudo dos Collembola. João Pessoa, Paraíba: Editora Universitária, Universidade Federal da Paraíba. 82 p. 2004.
- ZEPPELINI, D. & OLIVEIRA, J. V. L. C. Chaetotaxy of Neotropical *Cyphoderus caetetus* sp. nov. with comments on the taxonomic position of Cyphoderinae within Paronellidae (Collembola, Entomobryoidea). *Zootaxa*, v. 4098, p. 560-570. 2016.
- ZEPPELINI, D., BELLINI, B. C., CREÃO-DUARTE, A. J. & HERNANDÉZ, M. I. M. Collembola as bioindicators of restoration in mined sand dunes of Northeastern Brazil. *Biodiversity Conserv.*, v. 18, p. 1161-1170. 2009.