

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**GLAUCIO VALDAMERI**

**Avaliação da morte celular induzida por flavonas em células HepG2 e  
identificação de novos inibidores de ABCG2**

**CURITIBA**

**2012**

**GLAUCIO VALDAMERI**

**Avaliação da morte celular induzida por flavonas em células HepG2 e  
identificação de novos inibidores de ABCG2**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Eliane Merlin Rocha

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sheila Maria Brochado Winnischofer

Co-orientador: Dr. Attilio Di Pietro (IBCP – França)

CURITIBA

2012

TERMO DE APROVAÇÃO

GLAUCIO VALDAMERI

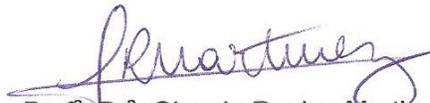
Avaliação da morte celular induzida por flavonas em células HepG2 e identificação de novos inibidores de ABCG2

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica, no programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eliane Merlin Rocha (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



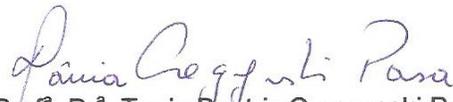
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glaucia Regina Martínez

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



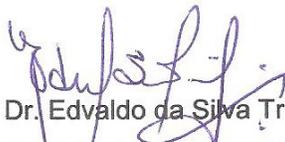
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mari Cleide Sogayar

Instituto de Química, Departamento de Bioquímica – USP



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tania Beatriz Creczynski Pasa

Departamento de Ciências Farmacêuticas (CCS) - UFSC



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

Departamento de Biologia Celular e Molecular - UFPR

Curitiba, 30 de março de 2012.

Dedico este trabalho a todos que participaram direta ou indiretamente durante esta etapa da minha vida, principalmente minha noiva Vivian e minha família. Tenham certeza que sem o apoio incondicional de vocês eu não teria conseguido.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida;

A minha noiva Vivian, agradeço por me fazer sorrir... Por me fazer acreditar que sou capaz... Por me acompanhar, apoiar e me incentivar até o final desta jornada;

Aos meus guardiões e incentivadores, mãe Dorilde, pai Ildo, irmão Claucus, cunhada Ionara e sobrinhos Davi e Isabela;

A família da minha noiva, Adalberto Moure "*in memoriam*" (um exemplo a ser seguido), Vera e Danilo Moure;

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Maria Eliane M. Rocha, pela orientação, confiança e conselhos desde o início do mestrado até a conclusão do doutorado;

A minha co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Sheila M. B. Winnischofer, pela orientação, atenção e apoio durante toda a tese;

Ao meu orientador do estágio de doutoramento Dr. Attilio Di Pietro, pela orientação, confiança e amizade (*Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi*);

As professoras do laboratório Dr<sup>a</sup>. Eva G. S. Carnieri, Dr<sup>a</sup>. Silvia M. S. C. Cadena, Dr<sup>a</sup>. Gulhermina R. Noleto e Dr<sup>a</sup>. Glaucia R. Martinez, pelo acompanhamento do trabalho, ajuda e motivação;

A Dr<sup>a</sup>. Mari Cleide Sogayar e a doutoranda Marina T. Lima pela colaboração neste projeto. Também sou extremamente grato a Dr<sup>a</sup>. Mari Cleide Sogayar por me aceitar no curso de Biologia Molecular da Transformação Maligna, realizado em seu laboratório no IQ-USP e por avaliar meu projeto de estágio de doutoramento;

Aos grandes amigos de Ap. Doumit Camilios Neto, Arquimedes P. de Santana Filho e Alex do Amaral;

Aos amigos Franco-Brasileiros Luciano e Vandrêa;

As amigas e colegas de laboratório que já deixaram o 'oxidações', Tatiana Herrerias e Stelia Carolina M. Sánches;

Aos amigos e colegas de laboratório que caminharam juntos durante esta jornada, Elizabeth Cunha, Andréia Akemi, Thiago jacomasso, Gustavo Jabor, Amanda R. Pires, Carol Valente, Juliana Kenski, Fernanda Barbosa, Anna Paula Brandt, Carina Scoparo, Camila Tamiello, Juliana Amorin, Hudson Amstalden e principalmente ao Paulo Worfel, pelas conversas e conselhos;

Aos meus amigos e colegas da equipe Di Pietro no IBCP-França, Héléle Baubichon-Cortay, Vincent Chaptal, Pierre Falson, Lorena Martinez, Ophelie Arnaud, Doriane Lorendau, Charlotte Gauthier, Julien Dauvergne, Elodie Desuzinges, Rhimi Moez,

Lauriane Dury, Jessica El Khoury e Sandrine Magnard (*Je vous embrasse très fort! Merci à tous...*);

Agradeço a todos meus amigos que não fazem parte do departamento de Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, bem como os que fazem;

Ao programa de Pós-graduação em Bioquímica da UFPR;

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e CAPES pela bolsa de PDEE (estágio de doutoramento);

A todos que participaram desta jornada e contribuíram para meu crescimento profissional e principalmente pessoal.

“Seja você a mudança que quer ver no mundo”

*Mahatma Ghandi*

## RESUMO

O Carcinoma hepatocelular (CHC) está entre os tumores com pior prognóstico e a quimioterapia disponível não é eficaz. A quimioresistência está associada com o fenótipo MDR (resistência a múltiplas drogas), o qual envolve, principalmente, a superexpressão de transportadores ABC na membrana plasmática de células tumorais. Neste trabalho foram abordadas duas estratégias de investigação: (i) identificação de compostos naturais que induzem morte em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e (ii) identificação de inibidores de ABCG2 (um dos transportadores ABC envolvidos na resistência a quimioterapia) em células que superexpressam este transportador. Os efeitos das flavonas (flavona e apigenina) foram avaliados em células de hepatoma humano (HepG2). A flavona induziu morte em células HepG2 sem alteração dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ainda foi capaz de induzir um aumento na expressão das principais enzimas antioxidantes (CuZnSOD, MnSOD e Gred). O provável mecanismo de morte celular induzido pela flavona em células HepG2 também não envolve a via mitocondrial, pois não induziu liberação de citocromoc no citosol e nem alterou o potencial de membrana mitocondrial, sugerindo um mecanismo via receptor de morte. A apigenina, por sua vez, induziu morte celular com aumento dos níveis de EROs, sendo que a catalase teve um papel central neste efeito. O tratamento de células HepG2 com a apigenina levou a uma diminuição nos níveis de mRNA da catalase, que consequentemente resultou em diminuição na atividade enzimática. Quando realizado um co-tratamento de apigenina e catalase exógena foi observada uma proteção parcial da morte celular induzida pela apigenina, sugerindo o envolvimento de EROs (especialmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Desta forma, os resultados indicam que flavonas hidroxiladas, como a apigenina, apresentam um mecanismo diferente na indução de morte celular que o induzido pela flavona (anel sem substituinte) e que esta classe de flavonóides é promissora para estudos adicionais visando o tratamento do CHC. Quanto ao transportador ABCG2, foi observado que a hispidulina (representante das flavonas) inibe o transporte de mitoxantrona por este transportador, porém apresentou baixa afinidade. Adicionalmente, foram identificadas três classes de potentes inibidores específicos de ABCG2: as chalconas, cromonas e estilbenos. De uma série de 44 chalconas (e análogos), foram identificados vários substituintes e posições importantes para inibição de ABCG2, permitindo fazer um modelo molecular de relação estrutura-atividade (3D-QSAR). Seis chalconas apresentaram um IC<sub>50</sub> abaixo de 0,5 µM e completa inibição de ABCG2. Dentre estas, duas apresentaram baixa citotoxicidade, tornando-se potenciais candidatos para testes *in vivo*. Baseados em dados anteriores obtidos com as acridonas (outra classe de inibidores específicos de ABCG2) foi possível chegar às cromonas, as quais foram identificadas nesse trabalho como inibidores específicos de ABCG2. As cromonas não são transportadas por ABCG2, apresentam alta afinidade, além de baixa citotoxicidade (IC<sub>50</sub> de 0,11 µM para a cromona **6g**). Essas características das cromonas (tendo como principal representante a cromona **6g**) as tornam os melhores inibidores de ABCG2 já descrito em ensaios *in vitro*. A terceira classe identificada como inibidora de ABCG2 nesse trabalho foi a dos estilbenos, que também apresentaram uma alta afinidade para inibir ABCG2 (estilbeno **9** = IC<sub>50</sub> de 0,16 µM), entretanto, essa classe de compostos não apresentou uma inibição completa (máximo de inibição de 75%). Observou-se também diferenças no mecanismo de inibição quando comparado a inibidores de referência como o GF120918. Para finalizar, foi possível provar a existência de diferentes sítios de inibição em ABCG2 e que estes sítios são diferentes do sítio de transporte, sendo que o mecanismo de inibição é não-competitivo e promovido através de mudanças conformacionais. Com estes resultados, foi desenvolvido um modelo posicionando inibidores que bloqueiam parcialmente e completamente o transporte de substratos por ABCG2.

## ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) has a poor prognosis and the available chemotherapy is ineffective. The chemoresistance is associated with classical MDR (multidrug resistance) phenotype, which mainly involves the overexpression of the membrane efflux pumps in cancer cells, reducing the intracellular drug accumulation by pumping these agents out of the tumor cells. In this work, two strategies were used for the development of compounds to be used in cancer treatment: (i) identification of natural product-derived compounds that induce cell death in cancer cells, using HepG2 cells as model, and (ii) identification of ABCG2 inhibitors (an ABC transporter involved in drug resistance) in cells overexpressing ABCG2. The effects of flavones (flavone and apigenin) were evaluated in human hepatoma cell line (HepG2). Flavone-induced cell death is independent of the reactive oxygen species (ROS) and was also able to increase the mRNA expression levels of the main antioxidant enzymes. The probable mechanism of flavone-induced cell death in HepG2 cells is independent of the mitochondrial pathway because flavone did not promote cytochrome c release into cytosol or changes in the mitochondrial membrane potential, suggesting a mechanism mediated by death receptors. On the other hand, apigenin-induced cell death was mediated by ROS, in which the catalase was the pivotal player. The apigenin treatment promotes downregulation of catalase mRNA expression levels and consequently decreasing of its activity. When it was performed co-treatment with apigenin and exogenous catalase was observed a partial protection from apigenin-induced cell death, suggesting ROS involvement (especially H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Thus, the results indicate, that hydroxylated flavones, such as apigenin, present a different mechanism of cell death in comparison with flavone-induced cell death and highlight the potential of these flavonoids in the treatment of HCC. For the ABCG2 transporter was observed that hispidulin (a flavone) inhibits ABCG2 drug-efflux activity with low affinity. However, three classes as potent ABCG2-selective inhibitors were identified: chalcones, stilbenes and chromones. A series of 44 chalcones and analogs were examined and several substituents were crucial for ABCG2 inhibition, allowing us to build a three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D QSAR) model. Six chalcones showed IC<sub>50</sub> values below 0.5 μM and a total ABCG2 inhibition. Among them, two chalcones showed low cytotoxicity and are promising for *in vivo* studies. Based on previous data obtained with acridones (another class of ABCG2-specific inhibitors), the acridone moiety was replaced by a chromone core, which was identified in this work as a class of ABCG2-specific inhibitors. The chromones were not transported by ABCG2, presenting low cytotoxicity and high affinity (IC<sub>50</sub> = 0.11 μM for chromone **6g**). These properties of chromones (mainly represented by the chromone derivative **6g**) suggest them as the best ABCG2-inhibitor described using *in vitro* assays. The third class identified for ABCG2 inhibition was the stilbenes, which also showed high affinity (stilbene **9** showed a IC<sub>50</sub> = 0.16 μM), however, inducing a partial inhibition (maximal inhibition of 75%). Differences in the mechanism of inhibition were also observed when compared to reference inhibitors, such as GF120918. Finally, it was possible to prove the existence of different sites of ABCG2 inhibition, which are different from the transport site, with noncompetitive inhibition and through conformational changes. These results have allowed us to develop a model positioning inhibitors which partially and completely block the ABCG2 drug-transport activity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – INCIDÊNCIA DE CHC NO MUNDO.....	20
FIGURA 2 – FASES DO CICLO CELULAR .....	23
FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DE CICLINAS/CDKs NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR.....	24
FIGURA 4 – DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE APOPTOSE E NECROSE.....	26
FIGURA 5 – VIA APOPTÓTICA MEDIADA POR RECEPTOR DE MORTE E VIA MITOCONDRIAL .....	29
FIGURA 6 – HOMODÍMERO DE NBDs DESTACANDO OS MOTIVOS Walker A, Walker B E Assinatura C .....	34
FIGURA 7 – ESTRUTURA TOPOLOGIA DOS TRANSPORTADORES ABC .....	35
FIGURA 8 – ESTRUTURA DA P-gp .....	37
FIGURA 9 – ESTRUTURA DO FTC, GF120918 E Ko 143 .....	41
FIGURA 10 - ESTRUTURA DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C .....	43
FIGURA 11 – ESTRUTURA DAS DIFERENTES CLASSES DE FLAVONÓIDES.....	44
FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DA FLAVONA, APIGENINA E HISPIDULINA.....	49
FIGURA 13 – ESTRUTURA QUÍMICA DA MORINA.....	51
FIGURA 14 – ESTRUTURA GERAL DAS CHALCONAS.....	52
FIGURA 15 – ESTRUTURA GERAL DAS CROMONAS E ESTILBENOS .....	52
FIGURA 16 – EFEITOS DA FLAVONA E APIGENINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS HepG2.....	68
FIGURA 17 – EFEITOS DA FLAVONA E APIGENINA NA LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C NO CITOSOL .....	70
FIGURA 18 – EFEITOS DA FLAVONA SOBRE DANOS NO DNA E EXPRESSÃO DE p21 .....	72
FIGURA 19 – EFEITOS DA FLAVONA SOBRE A EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E FRAGMENTAÇÃO DE DNA .....	74
FIGURA 20 – EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ ).....	75
FIGURA 21 – EFEITOS DA FLAVONA NOS NÍVEIS DE ERO .....	77
FIGURA 22 – EFEITOS DA FLAVONA NA EXPRESSÃO DO mRNA DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	78
FIGURA 23 – EFEITOS DA APIGENINA SOBRE A FRAGMENTAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS HepG2 .....	80
FIGURA 24 – EFEITOS DA APIGENINA NA MORFOLOGIA CELULAR.....	81
FIGURA 25 – EFEITOS DA APIGENINA SOBRE OS NÍVEIS DE ERO EM CÉLULAS HepG2 .....	82
FIGURA 26 – EFEITOS DA APIGENINA NOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE mRNA E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	83
FIGURA 27 – EFEITOS DO CO-TRATAMENTO DE APIGENINA E ANTIOXIDANTES NA VIABILIDADE CELULAR .....	85
FIGURA 28 – ESTRUTURA BASE DAS CHALCONAS E ANÁLOGOS.....	88
FIGURA 29 – MODELO MOLECULAR DAS CHALCONAS E ANÁLOGOS.....	93
FIGURA 30 – SELETIVIDADE DAS CHALCONAS E ANÁLOGOS PARA INIBIR ABCG2 EM RELAÇÃO A P-gp (ABCB1) E MRP1 (ABCC1) .....	94

FIGURA 31 – IC <sub>50</sub> DE INIBIÇÃO DE ABCG2 E CITOTOXICIDADE DAS CHALCONAS.	96
FIGURA 32 – IC <sub>50</sub> GF120918, anel básico das acridonas e cromonas .....	98
FIGURA 33 – ESTRUTURAS DAS ACRIDONAS E INIBIÇÃO DE P-gp (ABCB1) .....	102
FIGURA 34 – CITOTOXICIDADE DAS CROMONAS .....	104
FIGURA 35 – TRANSPORTE DAS CROMONAS POR ABCG2.....	105
FIGURA 36 – SENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS SUPEREXPRESSANDO ABCG2 PELAS CROMONAS.....	107
FIGURA 37 – EFEITO DAS CROMONAS SOBRE A EXPRESSÃO DE ABCG2 .....	108
FIGURA 38 – EFEITO DOS ESTILBENOS SOBRE O TRANSPORTE DE RODAMINA EM P-gp E O MUTANTE R482T DE ABCG2 .....	112
FIGURA 39 – CITOTOXICIDADE DOS ESTILBENOS .....	113
FIGURA 40 – TRANSPORTE DOS ESTILBENOS POR ABCG2.....	114
FIGURA 41 – AÇÃO DOS ESTILBENOS NA SENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM ABCG2 .....	115
FIGURA 42 – TIPO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE MITOXANTRONA.....	116
FIGURA 43 – EFEITO DOS ESTILBENOS SOBRE A ATIVIDADE ATPase DE ABCG2 .....	117
FIGURA 44 – BI-MODULAÇÃO DOS ESTILBENOS EM SOBRE A INIBIÇÃO DE ABCG2 .....	118
FIGURA 45 – ESTRATÉGIA USADA PARA TRANSFORMAR UM SUBSTRATO EM INIBIDOR.....	119
FIGURA 46 – NÚMERO DE HILL DOS DIFERENTES SUBSTRATOS DE ABCG2.....	121
FIGURA 47 – TIPO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE MITOXANTRONA.....	124
FIGURA 48 – EFEITOS DO VANADATO, INIBIDORES E SUBSTRATOS SOBRE A INTERAÇÃO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 5D3 À ABCG2 .....	125
FIGURA 49 – EFEITOS DO VANADATO, INIBIDORES E SUBSTRATOS SOBRE A INTERAÇÃO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 5D3 À ABCG2 APÓS EXPOSIÇÃO AO VANADATO.....	126
FIGURA 50 – EFEITOS DO GF120918 E ESTILBENO 9 SOBRE A INTERAÇÃO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 5D3 À ABCG2 APÓS EXPOSIÇÃO AO VANADATO .....	128
FIGURA 51 – MODELO DA AÇÃO DE DIFERENTES INIBIDORES DE ABCG2.....	129
FIGURA 52 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS EFEITOS E HIPÓTESES DE MECANISMOS DE AÇÃO DA FLAVONA E DA APIGENINA SOBRE CÉLULAS HepG2 .....	131

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PRINCIPAIS DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE APOPTOSE E NECROSE.....	26
TABELA 2 – NOMENCLATURA ATUAL PARA DIFERENTES TIPOS DE MORTE CELULAR.....	27
TABELA 3 – SUBSTRATOS DOS TRANSPORTADORES ABC (P-gp, MRP1 E ABCG2) .....	36
TABELA 4 – INIBIDORES DOS TRANSPORTADORES ABC (P-gp, MRP1 E ABCG2) .	39
TABELA 5 – EFEITO DE FLAVONÓIDES FRENTE A VÁRIAS LINHAGENS CELULARES .....	47
TABELA 6 – SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA qRT-PCR.....	62
TABELA 7 - EFEITO DOS FLAVONÓIDES SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLUAS HepG2 .....	67
TABELA 8 - EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE ABCG2, P-gp E MRP1 .....	87
TABELA 9 – CLASSIFICAÇÃO DAS DIFERENTES CHALCONAS QUANTO A CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE MITOXANTRONA EM CÉLULAS HEK293ABCG2 .....	90
TABELA 10 – INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE MITOXANTRONA POR INDOLILFENILPROPENONAS EM CÉLULAS HEK293ABCG2 .....	91
TABELA 11 – VALORES DE IC <sub>50</sub> DE INIBIÇÃO DE ABCG2 E CITOTOXICIDADE DAS CHALCONAS E ANÁLOGOS .....	96
TABELA 13 – SELETIVIDADE DAS CROMONAS PARA INIBIR ABCG2 EM RELAÇÃO A P-GP (ABCB1) E MRP1 (ABCC1).....	101
TABELA 14 – ESTRUTURA DOS METOXI <i>trans</i> -ESTILBENOS .....	110
TABELA 15 – INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE SUBSTRATOS PELOS ESTILBENOS EM CÉLULAS HEK293ABCG2, HEK293ABCB1 E HEK293ABCC1 .....	111
TABELA 16 – COMPETIÇÃO DE SUBSTRATOS <i>versus</i> SUBSTRATOS EM CÉLULAS HEK293ABCG2 .....	122
TABELA 17 – INIBIÇÃO DE DIFERENTES INIBIDORES <i>versus</i> DIFERENTES SUBSTRATOS .....	123

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AIF – Fator indutor de apoptose

ADP - Adenosina difosfato

ARE – *antioxidant response element*

ATP – Adenosina trifosfato

BCA - Método do ácido bicinconínico

BHA – Butilhidroxianisol

BHT - Butilhidroxitolueno

CHC – Carcinoma hepatocelular

cDNA – DNA complementar

DCFDA - 2'-7'-Dichlorodihidroluoresceína diacetato

DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

EROs – Espécies reativas de oxigênio

HEK293ABCB1 - células da linhagem HEK293 transfectadas de maneira estável para superexpressar P-gp

HEK293ABCC1 - células da linhagem HEK293 transfectadas de maneira estável para superexpressar MRP1

HEK293ABCG2 - células da linhagem HEK293 transfectadas de maneira estável para superexpressar ABCG2

IC<sub>50</sub> - Concentração responsável por obter 50% de redução na inibição máxima do transporte de substratos

IG<sub>50</sub> - Concentração necessária do composto para obter 50% na redução de células viáveis

MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

MXR - Mitoxantrona

NDB – Domínio de ligação a nucleotídeo

Nrf2 - *NF-E2-related factor 2*

PBS – Tampão fosfato-salino

Pi – Fosfato inorgânico

SFB – Soro fetal bovino

Rho123 – Rodamina 123

RNAi – RNA de interferência

mRNA – RNA mensageiro

TBS – Tampão tris-salino

TBST - Tampão tris-salino com Tween 20

TMD – Domínio transmembrana

VHB – Vírus da hepatite B

VHC – Vírus da hepatite C

Vi – Vanadato

$\Delta\psi$  – Potencial de membrana mitocondrial interno

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC).....	20
2.1.1. Diagnóstico e tratamento do CHC.....	21
2.2. ALVOS CELULARES DE COMPOSTOS ANTITUMORAIS.....	22
2.2.1. Ciclo celular .....	22
2.3. PROCESSOS DE MORTE CELULAR E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO.....	25
2.3.1. Apoptose <i>versus</i> Necrose .....	25
2.3.2. Diferentes mecanismos de morte celular .....	26
2.4. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs).....	30
2.5. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A DROGAS.....	32
2.5.1. Transportadores ABC .....	33
2.5.1.1. Topologia dos transportadores ABC .....	34
2.5.1.2. Funções dos transportadores ABC .....	35
2.5.1.3. P-gp .....	36
2.5.1.4. MRP1.....	37
2.5.1.5. ABCG2.....	38
2.5.1.6. Uso de inibidores dos transportadores ABC.....	39
2.5.1.6.1. Uso de inibidores de ABCG2 .....	41
2.6. FLAVONÓIDES.....	43
2.6.1 Classificação dos flavonóides .....	43
2.6.2. Atividades biológicas dos flavonóides e relação estrutura-atividade .....	44
2.6.2.1. Flavonas .....	49
2.6.2.1.1. Flavona.....	49
2.6.2.1.2. Apigenina.....	50
2.6.2.1.3. Hispidulina .....	50
2.6.2.2. Flavonóis .....	51
2.6.2.3. Chalconas.....	51
2.7. CROMONAS E ESTILBENOS .....	52
2.7.1. Cromonas .....	53
2.7.2. Estilbenos .....	53
3. OBJETIVOS.....	54
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	55

4.1. MATERIAIS E REAGENTES.....	55
4.1.1. Compostos utilizados como inibidores de ABCG2 .....	55
4.2. SOLUÇÕES .....	55
4.3. CÉLULAS.....	55
4.4. VIABILIDADE CELULAR.....	56
4.4.1. CRISTAL VIOLETA.....	56
4.4.2. MTT .....	56
4.5. LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C NO CITOSOL.....	57
4.6. ANÁLISE DE CICLO CELULAR.....	57
4.7. DUPLA MARCAÇÃO COM ANEXINA V/IODETO DE PROPÍDIO .....	58
4.8. ANÁLISE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	58
4.9. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ERO EM MICROPLACA USANDO DCFDA .	58
4.10. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EROs POR CITOMETRIA DE FLUXO USANDO DCFDA.....	59
4.11. MICROSCOPIA OPTICA POR COLORAÇÃO COM HETOXILINA-EOSINA.....	59
4.12. ENSAIO COMETA.....	59
4.13. WESTERN BLOT .....	60
4.14. ISOLAMENTO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA .....	61
4.15. QUANTIFICAÇÃO DO mRNA POR qRT-PCR EM TEMPO REAL .....	61
4.16. MEDIDA DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	62
4.16.1. ATIVIDADE DA CATALASE.....	62
4.16.2. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	63
4.16.3. GLUTATIONA REDUTASE (Gred).....	63
4.17. INIBIÇÃO DOS TRANSPORTADORES ABC (ABCG2, P-gp E MRP1) .....	63
4.18. MEDIDA DA ATIVIDADE ATPase DE ABCG2 .....	64
4.19. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DOS COMPOSTOS POR HPLC-MS/MS .....	64
4.20. USO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 5D3.....	65
4.21. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA .....	65
4.22. MODELO MOLECULAR.....	65
4.23. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
5.1. EFEITO DOS FLAVONÓIDES SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 ...	67
5.2. EFEITOS DA FLAVONA E APIGENINA NA LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C NO CITOSOL EM CÉLULAS HepG2.....	70
5.3. EFEITOS DA FLAVONA EM CÉLULAS HepG2 .....	71

5.3.1. EFEITOS DA FLAVONA SOBRE A GERAÇÃO DE DANOS AO DNA E EXPRESSÃO DE p21 EM CÉLULAS HepG2 .....	71
5.3.2. EFEITOS DA FLAVONA SOBRE A EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS HepG2.....	73
5.4.3. EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ ) EM CÉLULAS HepG2 .....	75
5.4.4. EFEITOS DA FLAVONA NOS NÍVEIS DE EROs EM CÉLULAS HepG2 .....	76
5.4.5. EFEITOS DA FLAVONA NA EXPRESSÃO DO mRNA DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS HepG2 .....	77
5.5. EFEITOS DA APIGENINA EM CÉLULAS HepG2 .....	79
5.5.1. EFEITOS DA APIGENINA SOBRE A FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS HepG2.....	79
5.5.2. EFEITOS DA APIGENINA SOBRE A MORFOLOGIA EM CÉLULAS HepG2	80
5.5.3. EFEITOS DA APIGENINA SOBRE OS NÍVEIS DE EROs EM CÉLULAS HepG2.....	81
5.5.4. EFEITOS DA APIGENINA SOBRE A EXPRESSÃO DO mRNA E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS HepG2.....	82
5.5.5. EFEITOS DA ADIÇÃO DE CATALASE EXÓGENA EM CÉLULAS HepG2 EXPOSTAS A APIGENINA.....	83
5.6. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE ABCG2.	86
5.6.1. EFEITOS DA HISPIDULINA .....	86
5.6.1.1 EFEITOS DA HISPIDULINA COMO INIBIDOR DE ABCG2, P-gp e MRP1..	86
5.6.2. EFEITOS DAS CHALCONAS .....	88
5.6.2.1. EFEITOS DAS CHALCONAS COMO INIBIDORES DE ABCG2 .....	88
5.6.2.2. MODELO MOLECULAR DA INIBIÇÃO DE ABCG2 PELAS CHALCONAS.	92
5.6.2.3. EFEITOS DAS CHALCONAS COMO INIBIDOR DE P-gp (ABCB1) E MRP1 (ABCC1).....	93
5.6.2.4. IC <sub>50</sub> DE INIBIÇÃO DE ABCG2 E CITOTOXICIDADE DAS CHALCONAS...	94
5.6.2.5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM AS CHALCONAS E ANÁLOGOS .....	97
5.6.3. CROMONAS.....	98
5.6.3.1. EFEITOS DAS CROMONAS COMO INIBIDORES DE ABCG2 .....	99
5.6.3.2. EFEITOS DAS CROMONAS COMO INIBIDORES DE P-gp (ABCB1) E MRP1 (ABCC1) E COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS DAS ACRIDONAS ..	101
5.6.3.3. CITOTOXICIDADE DAS CROMONAS.....	103
7.1.3.4. QUANTIDADE INTRACELULAR DAS CROMONAS EM CÉLULAS HEK293 SUPEREXPRESSANDO ABCG2 .....	105

5.6.3.5. AÇÃO DAS CROMONAS NA SENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM ABCG2 PELAS CROMONAS .....	105
5.6.3.6. EFEITO DAS CROMONAS SOBRE A EXPRESSÃO DE ABCG2.....	107
5.6.3.7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM AS CROMONAS.....	108
5.6.4. EFEITOS DOS ESTILBENOS.....	109
5.6.4.1. EFEITOS DOS ESTILBENOS COMO INIBIDORES DE ABCG2, P-gp E MRP1 .....	110
5.6.4.2. CITOTOXICIDADE DOS ESTILBENOS.....	112
5.6.4.3. QUANTIDADE INTRACELULAR DOS ESTILBENOS EM CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM ABCG2 .....	113
5.6.4.4. AÇÃO DOS ESTILBENOS NA SENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM ABCG2 .....	114
5.6.4.5. TIPO DE INIBIÇÃO PROVOCADA PELOS ESTILBENOS.....	115
5.6.4.6. EFEITO DOS ESTILBENOS SOBRE A ATIVIDADE ATPase DE ABCG2 .	116
5.6.4.7. BI-MODULAÇÃO USANDO ESTILBENOS SOBRE A INIBIÇÃO DE ABCG2 .....	117
5.6.4.7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM OS ESTILBENOS .....	118
5.6.5. MECANISMO DE INIBIÇÃO DE ABCG2.....	120
5.6.5.1. NÚMERO DE HILL DOS DIFERENTES SUBSTRATOS DE ABCG2.....	120
5.6.5.2. COMPETIÇÃO DE SUBSTRATOS <i>versus</i> SUBSTRATOS.....	121
5.6.5.3. INIBIÇÃO DE DIFERENTES INIBIDORES <i>versus</i> DIFERENTES SUBSTRATOS .....	122
5.6.5.4. TIPO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE MITOXANTRONA .....	123
5.6.5.5. EFEITOS DO VANADATO, INIBIDORES E SUBSTRATOS SOBRE A INTERAÇÃO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 5D3 À ABCG2 .....	124
5.6.5.6. MODELO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE SUBSTRATOS EM ABCG2 .....	128
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	130
7. CONCLUSÕES.....	133
REFERÊNCIAS .....	135
ANEXOS.....	153

## 1. INTRODUÇÃO

O Carcinoma hepatocelular (CHC) está entre os tumores com maior incidência no mundo e é um dos mais agressivos (EL-SERAG, 2011). Um dos maiores desafios no tratamento do CHC é encontrar drogas mais eficientes para serem utilizadas por via sistêmica, pois os quimioterápicos utilizados atualmente não apresentam bons resultados, sendo a ressecção cirúrgica o tratamento de primeira escolha em pacientes que são diagnosticados em estágios iniciais do desenvolvimento do tumor. Outra dificuldade no tratamento do CHC e outros tipos de câncer utilizando quimioterápicos é a ocorrência de resistência ao tratamento. A resistência pode ser atribuída a diversos fatores, entretanto, a principal causa da ineficiência do tratamento por quimioterápicos é devido à superexpressão de transportadores ABC em células tumorais, promovendo um fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) (TAMAKI *et al.*, 2011).

Dentre os objetivos deste trabalho, destaca-se a avaliação dos efeitos de compostos sobre o processo de morte celular e sobre a reversão da resistência ao tratamento com outros quimioterápicos. Para identificar novos compostos capazes de induzir morte em células tumorais, foi selecionada uma classe descrita como promissora para essa atividade, as flavonas, que recentemente se mostraram seletivas quanto a indução de apoptose em diferentes células tumorais (ex: próstata e mama) (GUPTA *et al.*, 2001; WENZEL *et al.*, 2000) e inibidoras do transporte de alguns quimioterápicos realizado por transportadores ABC (BOUMENDJEL *et al.*, 2011; JUVALE *et al.*, 2012).

Para avaliar o potencial uso das flavonas no CHC, o modelo utilizado foi o de células de hepatoma humano da linhagem HepG2, visando melhor entender o mecanismo de morte celular induzido pelas flavonas. Nos últimos anos foram descritas atividades biológicas de várias flavonas substituídas em diversas linhagens de células tumorais, contudo, em modelo de hepatocarcinoma humano não são conhecidos os efeitos da flavona (núcleo sem substituinte) e da apigenina (5,7,4'-triidroxiflavona) em relação a expressão e atividade das principais enzimas antioxidantes e sua correlação com a indução de morte celular. Os resultados obtidos foram discutidos de forma comparativa com a finalidade de demonstrar a importância dos substituintes sobre os efeitos biológicos.

Dois principais transportadores ABC estão envolvidos na resistência a múltiplas drogas, são eles glicoproteína-P e ABCG2. Testes clínicos utilizando inibidores da proteína P-gp vêm sendo utilizados desde 2001, sendo que hoje já existe a 3ª geração de inibidores, com compostos mais potentes e específicos para esse transportador.

Contudo, realidade diferente é observada com ABCG2. A pesquisa de inibidores de ABCG2 tem avançado rapidamente, mas devido a sua descoberta ser muito mais recente que a da P-gp (1998 *versus* 1976), ainda não se tem disponível um potente inibidor desse transportador com potencial uso clínico.

Neste trabalho também foram testadas as capacidades de algumas flavonas, chalconas, cromonas e estilbenos de inibirem o transporte de quimioterápicos realizados por transportadores ABC em células tumorais, com a finalidade de reverter a resistência destas células ao tratamento com outros agentes quimioterápicos. O modelo utilizado neste trabalho foi o de células HEK293 superexpressando ABCG2, para tentar evitar outros mecanismos de resistência não relacionados com a presença deste transportador. Também buscamos caracterizar as diferenças entre os mecanismos de inibição proporcionados pelos diferentes compostos avaliados como inibidores do transportador ABCG2.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC)

O CHC é o quinto tipo de tumor mais prevalente em homens e o sétimo em mulheres no mundo. A cada ano surgem mais de meio milhão de novos casos de CHC, sendo a incidência maior em homens (EL-SERAG, 2011). Alguns autores apontam o CHC como a terceira causa de óbito relacionado ao câncer no mundo (BOSCH *et al.*, 2004; EL-SERAG, 2011).

Entre os maiores fatores de risco no desenvolvimento de CHC estão: (i) vírus da hepatite B (VHB), (ii) vírus da hepatite C (VHC), (iii) doenças alcoólicas do fígado e (iv) doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A distribuição mundial destes fatores de riscos é variável e depende principalmente da região geográfica e etnia (figura 1) (EL-SERAG *et al.*, 2007). Aproximadamente 50% dos casos de CHC são provenientes de infecção com VHB, chegando a 90% em regiões endêmicas, como Ásia e África. O risco de desenvolver CHC em pessoas infectadas por VHB pode ainda aumentar quando expostas a aflatoxina, tabaco, álcool ou ainda co-infectadas com VHC (EL-SERAG, 2011).

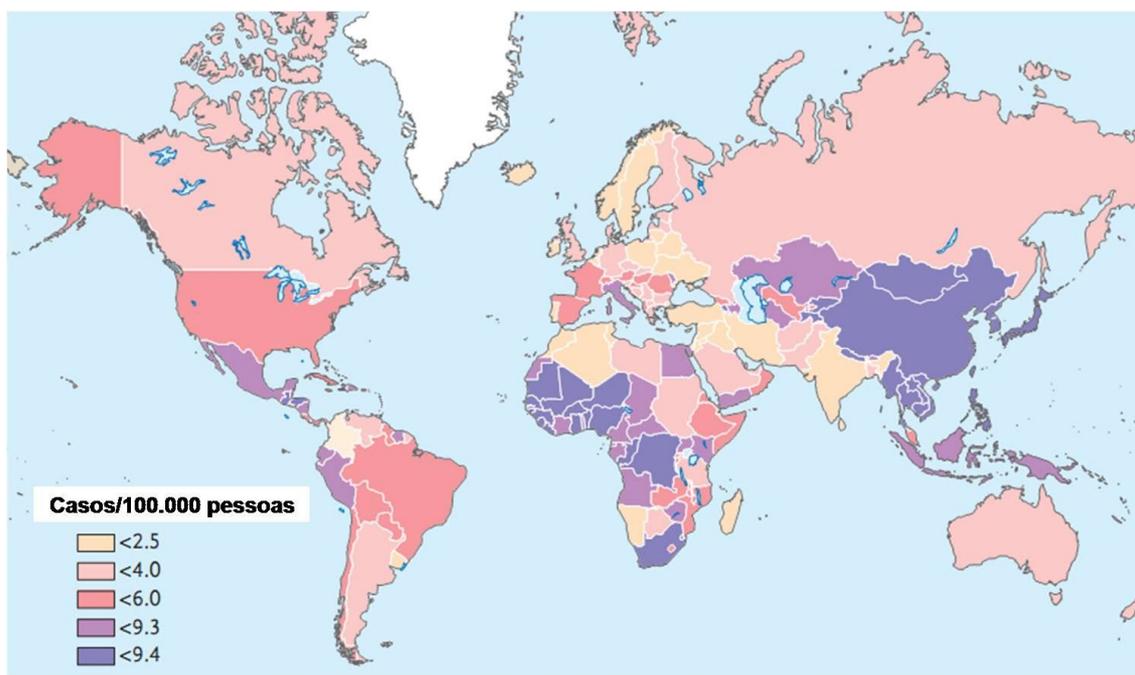


FIGURA 1 – INCIDÊNCIA DE CHC NO MUNDO  
FONTE: Adaptado (EL-SERAG, 2011)

Portadores do VHC apresentam um risco 15 a 20 vezes maior de desenvolver CHC, quando comparados a pessoas não infectadas (DONATO *et al.*, 2002). Entretanto, alguns estudos em países ocidentais mostraram que entre 30 a 40% dos pacientes com CHC não apresentavam infecção com VHB e VHC, sugerindo outros fatores envolvidos, relacionados à obesidade e ao diabetes tipo 2 (CALLE *et al.*, 2003). Alguns avanços têm sido feitos para prevenção da doença, pois desde que os programas de vacinação contra a hepatite B começaram a mais de 20 anos atrás, a incidência de CHC em crianças de 6 a 12 anos diminuiu em aproximadamente 70% (ZANETTI *et al.*, 2008).

### 2.1.1. Diagnóstico e tratamento do CHC

Em alguns casos, o diagnóstico de CHC pode ser feito através de métodos não invasivos (uso de imagens), mas o recomendado é o uso de imagens somado à biópsia de fígado (EL-SERAG, 2011).

As estratégias utilizadas no tratamento do CHC basicamente levam em consideração o estágio de desenvolvimento do tumor. Um dos tratamentos potencialmente curativos do CHC é a ressecção cirúrgica, estratégia de primeira escolha em pacientes que são diagnosticados em estágios iniciais do desenvolvimento do tumor, entretanto, o CHC é dificilmente diagnosticado nesta fase, limitando esse tipo de abordagem. Quando a ressecção não é recomendada, a ablação por radiofrequência ou ainda quimioembolização transarterial se tornam a segunda opção. Já em estágios mais avançados da doença, o transplante é a melhor opção, porém apresenta limitações quanto ao número de doadores e compatibilidade (BOSCH *et al.*, 2004). A eficiência do tratamento por ressecção do tumor nos primeiros estágios de CHC pode chegar a 90%, já o transplante, em casos mais avançados, pode superar uma taxa de sobrevivência maior que 5 anos em aproximadamente 75% dos casos (EL-SERAG *et al.*, 2008).

Quando tratamentos cirúrgicos não se tornam uma opção viável, resta a opção do tratamento por quimioterápicos via sistêmica, entretanto, essa estratégia não apresenta bons resultados e até o momento não se encontrou nenhum quimioterápico eficiente para o CHC. Esta abordagem terapêutica propicia aos pacientes uma sobrevida em torno de um ano em menos de 10% dos casos (EL-SERAG *et al.*, 2008). Entretanto, alguns quimioterápicos têm apresentado algum efeito promissor no tratamento do CHC, como a doxorubicina, etoposídeo, cisplatina, mitoxantrona, paclitaxel, irinotecan, gemcitabine, capecitabine, nolatrexed, 5-fluorouracil e também associações de algumas destas drogas (WRZESINSKI *et al.*, 2011). De acordo com Wrzesinski e colaboradores (2011), uma

série de fatores limita o tratamento por quimioterápicos em CHC, principalmente cirrose, presente na maioria dos casos, e mecanismos de resistência, devido à superexpressão de transportadores ABC capazes de transportar quimioterápicos (tema que será abordado em detalhes a seguir).

Recentemente, o sorafenib (inibidor de quinases) vem sendo testado em pacientes com CHC, entretanto, os resultados estão abaixo das expectativas, apresentando um ganho de apenas dois a três meses de vida, quando comparado ao grupo tratado com placebo (LLOVET *et al.*, 2008). Outros compostos como o brivanib e erlotinib também estão sendo testados em pacientes com CHC (EL-SERAG, 2011). Devido ao modesto benefício clínico obtido com as terapias sistêmicas atuais para CHC, existe uma grande necessidade de encontrar novas drogas com maior eficiência e se possível, atuando de maneira seletiva sobre células tumorais (WRZESINSKI *et al.*, 2011).

## 2.2. ALVOS CELULARES DE COMPOSTOS ANTITUMORAIS

O que distingue uma célula neoplásica de uma normal, além das alterações morfológicas e metabólicas, é a sua proliferação descontrolada, possíveis alterações de função e um alto poder invasivo, podendo levar à metástase. O mecanismo de ação de muitos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer altera o processo de proliferação, inibindo a progressão do ciclo celular, principalmente no processo de mitose.

### 2.2.1. Ciclo celular

A divisão celular é um processo finamente sincronizado capaz de controlar a taxa de proliferação celular. Este processo é dividido em quatro fases sequenciais que podem ser visualizadas na figura 2. A fase S (fase em que ocorre a duplicação do DNA), fase M (fase em que a célula sofre a divisão em duas células filhas, mitose) e as outras duas fases, G1 e G2, que são responsáveis pela conexão destas fases citadas acima. A fase G1 ocorre após o término da divisão celular (fase M), também é a fase onde a célula responde a sinais de crescimento, tanto positivos, quanto negativos. Este período é caracterizado pela transição e tradução de vários genes, levando a produção de proteínas necessárias para a síntese de DNA. A fase G2 inicia-se após a fase S e prepara a célula para entrada na mitose (GARRETT, 2001). Alguns autores nomeiam uma quinta fase (G0), também conhecida como fase quiescente, onde o ciclo se encontra parado, porém esta fase é reversível à fase G1, promovendo a continuidade do ciclo celular (ELSAYED e SAUSVILLE, 2001; GARRETT, 2001).

A proliferação celular é um processo altamente regulado em eucariotos, onde a maquinaria celular percebe a presença de fatores de crescimento ou fatores inibitórios, avançando ou interrompendo a progressão do ciclo, respectivamente. Diferentes pontos de checagem (*checkpoints*), presentes no ciclo celular são os responsáveis pela progressão ou parada do ciclo (BERTHET e KALDIS, 2007). Na figura 2 podemos observar alguns dos *checkpoints* e também o ponto de restrição “R”, localizado entre o meio e o final da fase G1, onde a célula confere se todos os sinais de crescimento necessários estão presentes e só então prossegue o ciclo celular para fase de replicação (fase S) (GARRETT, 2001).

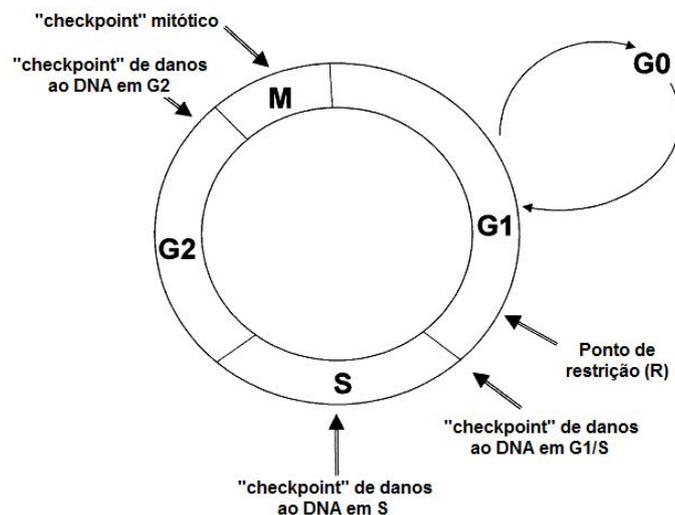


FIGURA 2 – FASES DO CICLO CELULAR  
 FONTE: Adaptado (GARRETT, 2001).

Normalmente, a progressão do ciclo celular em mamíferos é regulada pela ativação sequencial dos pares ciclinas (cyc) e quinases dependentes de ciclinas (Cdks). A atividade das Cdks é dependente da sua ligação a ciclinas específicas, sendo que esta ligação é a responsável por sua ativação. A atividade dos vários complexos de ciclinas/Cdks é responsável pelo controle da progressão celular através de cada fase do ciclo (MORGAN, 1997). A figura 3 ilustra a distribuição dos diversos pares de ciclinas/Cdks no ciclo celular (ELSAYED e SAUSVILLE, 2001).

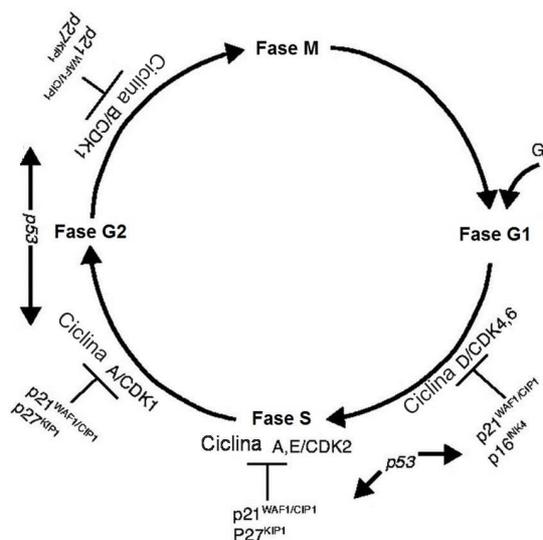


FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DE CICLINAS/CDKs NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR  
 FONTE: Adaptado (GARRETT, 2001).

A perda do controle do ciclo celular é um dos eventos responsáveis pelo aparecimento de células tumorais. Estas células podem ser modificadas como consequência de uma alteração da função das ciclinas/Cdks, superexpressão de oncogenes, anormalidade na função de fatores de crescimento e devido a mutações dos genes supressores tumorais.

Um dos principais supressores tumorais é a proteína p53, também chamada de “guardião do genoma”. O supressor de tumor p53 tem uma importante função na resposta celular a diferentes sinais de stress, como danos ao DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Uma vez que um dano ao DNA é detectado, a proteína p53 é a responsável por promover uma parada no ciclo celular até que o reparo do dano esteja completo. Caso isso não seja possível, p53 desencadeia uma via de sinalização intracelular promotora de morte, geralmente a via apoptótica, para que esse dano ao DNA não seja conservado durante o processo de replicação celular (VOUSDEN, 2006).

O mecanismo pelo qual p53 promove a parada no ciclo celular é através da indução da expressão de genes que codificam inibidores de Cdks, chamados de CKIs. Estes inibidores de quinases ciclina dependentes (CKIs) se ligam aos pares ciclina/CdK regulando negativamente o ciclo celular, os quais também podem ser chamados de supressores tumorais. Alguns genes supressores tumorais têm a função de inibir a atividade de ciclinas específicas, como é o caso da família de supressores INK4 (p15<sup>Ink4b</sup>, p16<sup>Ink4a</sup>, p18<sup>Ink4c</sup> e p19<sup>Ink4d</sup>) que são capazes de inibir os complexos da ciclina D e a

família CIP/KIP (p21<sup>cip1</sup>, p27<sup>kip1</sup> e p57<sup>kip2</sup>), que por sua vez são capazes de inibir o complexo da ciclina E (SHERR e ROBERTS, 1999).

Um dos primeiros CKIs descritos e melhor compreendido é a proteína p21, codificada pelo gene inibidor de crescimento p21<sup>waf1/cip1</sup>, que pode atuar em diferentes fases do ciclo celular (figura 3). Somado a sua capacidade de se ligar ao complexo cyc/CdK, p21 pode interagir com outras proteínas celulares envolvidas no crescimento, síntese ou reparo do DNA e na regulação transcricional (BLAGOSKLONNY, 2002). Dentre as várias classes de compostos que tem como alvo proteínas reguladoras do ciclo celular, os flavonóides têm se mostrado promissores por apresentarem este tipo de efeito, como no caso da apigenina, que é capaz de modular a expressão de p53 e p21 desencadeando diferentes mecanismos de morte celular (CHIANG *et al.*, 2006), entretanto, na maioria dos casos, o mecanismo observado é morte celular por apoptose dependente de caspases (SHUKLA e GUPTA, 2010).

### 2.3. PROCESSOS DE MORTE CELULAR E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO

Quimioterápicos utilizam uma ou mais vias para induzirem a morte das células tumorais, porém, a morte celular não ocorre apenas quando as células são expostas a compostos citotóxicos, mas também é uma maneira de controlar e promover a manutenção do organismo. Esta manutenção ocorre através da eliminação de células que apresentam danos, por diferentes mecanismos de morte celular programada (HERNANDEZ-MARTINEZ e COVARRUBIAS, 2011).

Embora as primeiras descrições morfológicas que relatam morte celular datarem de meados do século XIX (VANDENABEELE *et al.*, 2010), a primeira noção de morte celular programada foi descrita por Lockshin e Willians em 1964 (LOCKSHIN e WILLIAMS, 1964), sendo o termo apoptose descrito pela primeira vez em 1972 por Kerr e colaboradores. O termo apoptose foi introduzido para especificar mudanças morfológicas observadas nas células quando comparado com a morte celular por necrose, que até então era considerada uma via de morte celular puramente acidental (KERR *et al.*, 1972).

#### 2.3.1. Apoptose *versus* Necrose

Por muito tempo, aproximadamente três décadas, os dois termos utilizados para descrever morte celular foram necrose e apoptose, baseados puramente em mudanças morfológicas como observado na figura 4 e tabela 1.

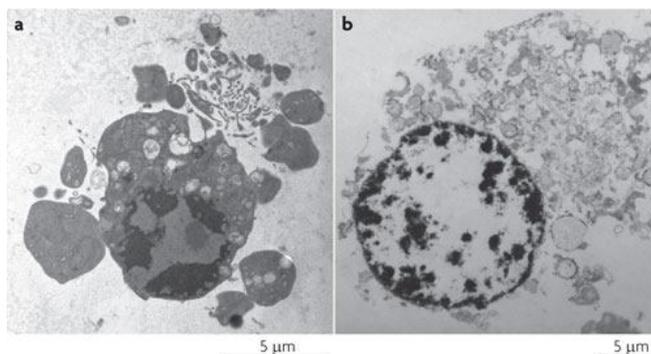


FIGURA 4 – DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE APOPTOSE E NECROSE

FONTE: Adaptado (VANDENABEELE *et al.*, 2010)

NOTA: (a) apoptose e (b) necrose.

TABELA 1 – PRINCIPAIS DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS ENTRE APOPTOSE E NECROSE

APOPTOSE	NECROSE
Diminuição do volume celular ( <i>pyknosis</i> )	Aumento no volume das organelas
Condensação da cromatina e fragmentação nuclear ( <i>karyorrhexis</i> )	Aumento do volume celular ( <i>oncosis</i> )
Aparecimento de 'bolhas' na membrana plasmática ( <i>blebbing</i> )	Citoplasma translúcido
Corpos apoptóticos	Pequenas alterações na estrutura do núcleo (dilatação da membrana nuclear)
Em modelo <i>in vivo</i> observa-se uma captura dos corpos apoptóticos por células vizinhas ou fagócitos profissionais	Ruptura da membrana plasmática

FONTE: Adaptado (VANDENABEELE *et al.*, 2010)

Contudo, mais recentemente Galluzzi e colaboradores (2012), propuseram novas recomendações de definições de apoptose, necrose e catástrofe mitótica, que serão descritas a seguir.

### 2.3.2. Diferentes mecanismos de morte celular

Uma das primeiras classificações para diferenciar os tipos de morte celular foi proposta por Schweichel and Merker, que separou em três classes: tipo I (ou heterofagia), tipo II (autofagia) e tipo III (morte celular sem digestão), mortes celulares atualmente nomeadas como apoptose, autofagia e necrose (SCHWEICHEL e MERKER, 1973). Contudo, com o aparecimento de métodos bioquímicos que possibilitaram quantificar a expressão, atividade e localização celular de proteínas envolvidas nos processos de morte celular, importantes contribuições para o melhor entendimento dos tipos de morte celular rapidamente apareceram.

Estes métodos quantificam de maneira mais precisa alguns eventos celulares e possibilitam distinguir fenômenos até então similares, quando levado em conta apenas os aspectos morfológicos, e assim, novas nomenclaturas para os eventos de morte celular surgiram. De acordo com o NCCD (*Nomenclature Committee on Cell Death*), modificações na nomenclatura dos diferentes tipos de morte celular foram atualizadas em 2012 (tabela 2).

TABELA 2 – NOMENCLATURA ATUAL PARA DIFERENTES TIPOS DE MORTE CELULAR

Nomenclatura	Fenômenos bioquímicos envolvidos	Envolvimento de caspases
<i>Anoikis</i>	↓ de EGFR, inibição da sinalização de ERK1, não envolvimento de $\beta$ 1-integrina, ↑ de BIM e ativação de caspases-3 (-6,-7)	Sim
Autofagia	Lipidação de MAP1LC3, degradação de SQSTM1	Não
Apoptose intrínseca caspase dependente	Dissipação irreversível do $\Delta\Psi$ , liberação de proteínas no espaço intramembrana, inibição da cadeia respiratória	Sim
Apoptose intrínseca caspase independente		Não
Apoptose extrínseca por receptor de morte	Sinalização por receptor de morte, ativação de caspases-8 (-10), clivagem de BID e MOMP (em células tipo II), ativação de caspases-3 (-6,-7)	Sim
Apoptose extrínseca dependente de receptor	Sinalização dependente de receptores, ativação de PP2A e DAPK1, ativação de caspase-9 (-3,-6 e -7)	Sim
<i>Cornification</i>	Ativação de transglutaminases, ativação de caspase-14	Sim
Entosis	Ativação de RHO e ROCK1	Não
Catástrofe mitótica	Ativação de caspase-2, TP53 ou TP73 (em alguns casos), bloqueio de mitose	Não
Necroptose	Sinalização via receptor de morte, inibição de caspase, ativação de RIP1 e/ou RIP3	Não
<i>Netosis</i>	Inibição de caspase, ativação de NADPH oxidase, liberação de NET (em alguns casos)	Não
<i>Parthanatos</i>	Acúmulo de PAR mediado por PARP1, Dissipação irreversível do $\Delta\Psi$ , depleção de ATP e NADH, ligação de PAR com AIF	Não
<i>Pyroptosis</i>	Ativação de caspase-1 (-7), secreção de IL-1 $\beta$ e IL-18	Sim

FONTE: Adaptado (GALLUZZI *et al.*, 2012).

NOTA: EGFR, receptor do fator de crescimento epidérmico; ERK1, quinase regulada por sinal extracelular 1; BIM, agonista de morte com domínio de interação BH3; MAP1LC3, cadeia leve 3 da proteína 1 associada aos microtúbulos; SQSTM1, *sequestosome* 1; MOMP, permeabilização da membrana mitocondrial externa; PP2A, proteína fosfatase 2A; DAPK1, proteína quinase 1 associada à morte; ROCK1, proteína quinase associada a Rho; TP53, supressor tumoral; TP73, supressor tumoral da família de TP53; RIP1, proteína 1 de interação com receptor; RIP3, Homólogo de RIP1; NET, armadilhas extracelulares neutrofílicas; PAR, poli (ADP-ribose); PARP1, polimerase poli (ADP-ribose); AIF, fator indutor de apoptose; IL-1 $\beta$ , interleucina-1 $\beta$ ; IL-18, interleucina-18.

Embora exista essa extensiva lista classificando diferentes mecanismos de morte celular, pouca informação está disponível até o momento e apesar de muitos esforços na área, ainda alguns autores divergem quanto a esta classificação. Entretanto, para certos eventos de morte celular os mecanismos são bem compreendidos, como por exemplo: Apoptose via extrínseca, intrínseca (dependente ou independente de caspases), necrose regulada, autofagia e catástrofe mitótica. A seguir, apresentamos resumidamente algumas características dos tipos de morte celulares melhores descritos (GALLUZZI *et al.*, 2012):

- **Apoptose via extrínseca:** A morte celular por apoptose via extrínseca é desencadeada por sinais extracelulares, os quais sensibilizam receptores específicos na membrana plasmática responsáveis por propagar os sinais. Os principais ligantes envolvidos na iniciação destes sinais através de receptores de morte são: Fas-L (ligante de Fas), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF) (CIRCU e AW, 2010; WAJANT, 2002).
- **Apoptose via intrínseca dependente ou independente de caspases:** Diversos fatores podem desencadear a via apoptótica intrínseca, como danos ao DNA, estresse oxidativo, acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol, aumento de proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático, entre outros. Embora os diferentes estímulos ativem uma cascata de sinalização celular, tanto de proteínas pró-apoptóticas (ex: BAK, BAX), quanto antiapoptóticas (ex: Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>), a via intrínseca se caracteriza pelo envolvimento direto com a mitocôndria, por isso muitos autores denominam a via intrínseca, como via mitocondrial (INDRAN *et al.*, 2011). Como consequência das alterações na permeabilidade mitocondrial pode se verificar: (i) Dissipação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ), (ii) liberação de proteínas mitocondriais para o citosol, como é o caso do citocromo *c* e AIF (fator indutor de apoptose), entre outras, (iii) inibição da cadeia respiratória, agravando e amplificando os sinais de morte celular (KROEMER *et al.*, 2007). Em alguns casos de apoptose via intrínseca, observa-se a dependência do envolvimento de caspases (confirmado por inibição farmacológica através do uso de inibidores químicos ou genética, através de RNAi), caracterizando assim a via intrínseca dependente de caspases. Já em outros casos, se observa eventos semelhantes aos citados acima, porém sem o envolvimento de caspases, caracterizando a via intrínseca independente de caspases (GALLUZZI *et al.*, 2012).

Na figura 5 podemos observar a via proposta por Circu e Aw (2010), interligando a via apoptótica mitocondrial e a mediada por receptor de morte. Segundo Circu e Aw (2010), na via extrínseca os ligantes reconhecem seus respectivos receptores ativando a

sinalização celular culminando na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. A ativação de NF- $\kappa$ B por essa via aumenta a transcrição de proteínas anti-apoptóticas, como a FLIP<sub>L</sub> ou MnSOD, responsáveis pelo bloqueio da apoptose (figura 5). Contudo, a via de morte celular via receptor de morte pode envolver a caspase-8, que pode ativar a caspase-3 ou ainda ativar a via mitocondrial. Os mesmos autores descrevem que a apoptose via intrínseca, com o envolvimento mitocondrial, pode ser desencadeada por diferentes fatores, como por exemplo; EROs, mediando a permeabilização mitocondrial e liberação de proteínas pró-apoptóticas. No citosol, o citocromo *c* liberado, juntamente com Apaf-1 e ATP, formam o apoptossomo, um complexo que vai ser o responsável por ativar a caspase-9, que subsequentemente vai ativar a caspase-3 (figura 5). A via dependente de caspases ainda pode ser potencializada pela neutralização de inibidores de caspases por proteínas apoptogênicas como a Smac/Diablo e Omi/HtrA2, as quais são também liberadas da mitocôndria (figura 5). Circu e Aw (2010) ainda destacam tanto a proteína AIF e a Endo G como cruciais na via independente de caspases, por mediar fragmentação do DNA.

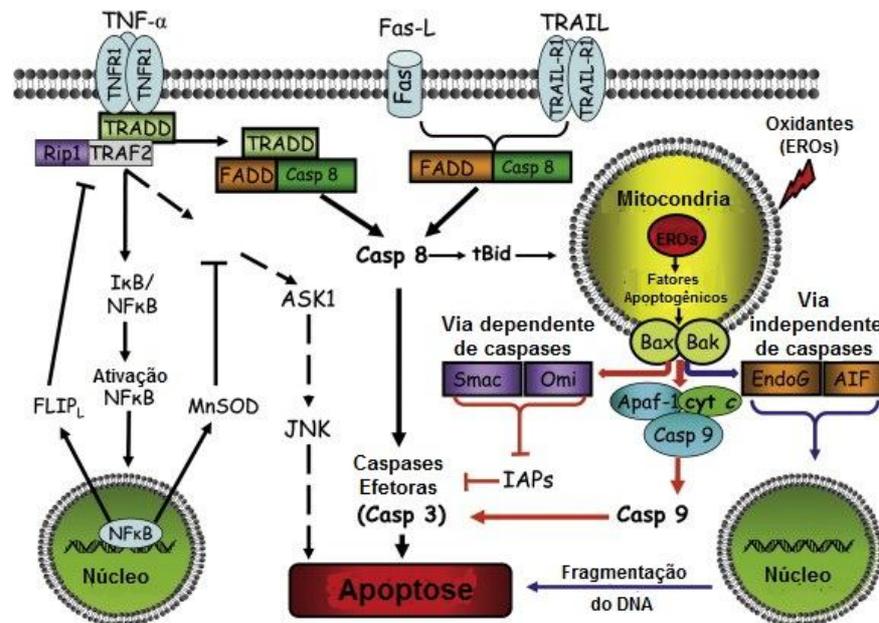


FIGURA 5 – VIA APOPTÓTICA MEDIADA POR RECEPTOR DE MORTE E VIA MITOCONDRIAL  
 FONTE: Adaptado (CIRCU e AW, 2010).

NOTA: ASK1, quinase 1 reguladora do sinal apoptótico; Apaf-1, protease pró-apoptótica; Bid, proteína pró-apoptótica com domínio BH3; tBid, forma truncada de Bid; FLIP<sub>L</sub>, proteína inibidora de FLICE; FADD, domínio de morte associado a Fas; Fas-L, ligante de Fas; JNK, quinase c-Jun N-terminal; NF- $\kappa$ B, fator nuclear de transcrição  $\kappa$ B, I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B, forma inativa de NF- $\kappa$ B associada ao seu inibidor; MnSOD, Manganês superóxido dismutase; RIP1, , proteína 1 de interação com receptor; EROs, espécies reativas de oxigênio; TNF $\alpha$ , fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; TNFR1, receptor de TNF; TRAIL, ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF; TRAIL-R1, receptor I de Trail; TRADD, domínio de morte associado ao receptor de TNF. Smac/Diablo, Segundo ativador mitocondrial de caspases; Omi/HtrA2, serina protease A2 requerente de alta temperatura; IAP, inibidor de proteínas apoptóticas; AIF, fator indutor de apoptose; Endo G, endonuclease G; Bax/Bak, proteínas pró-apoptóticas.

- **Necrose regulada:** Por muito tempo a necrose foi descrita como uma via de morte celular causada por situações extremas, sendo caracterizada como acidental e sem o envolvimento de sinalização ou vias de regulação como apoptose ou autofagia (KROEMER *et al.*, 2009). Esse conceito mudou e hoje se sabe que a necrose pode ocorrer de maneira regulada sendo induzida por diferentes maneiras, como danos ao DNA e moléculas que se ligam aos receptores de morte. O termo *necroptosis* também vem sendo utilizado para descrever a via necrótica regulada, a qual na maioria dos casos envolve a proteína sinalizadora RIP1 e/ou seu homólogo RIP3 (GALLUZZI *et al.*, 2012).
- **Autofagia:** Nas primeiras descrições de autofagia os traços morfológicos (principalmente o aparecimento de vacúolos) caracterizavam o fenômeno. Embora o termo 'autofagia' originalmente não caracterize um tipo de morte celular propriamente dito, esse conceito tem sido modificado. Após observarem (*in vivo*) que a autofagia pode mediar a morte celular em certos organismos como *D. melanogaster* (NEZIS *et al.*, 2010) e que a autofagia era responsável pela morte celular induzida por alguns quimioterápicos (*in vitro*), somado ao aparecimento de marcadores bioquímicos que caracterizam a via (ex: mutações ou RNAi de proteínas essenciais como AMBRA1, ATG5, ATG12 e beclina 1), hoje a autofagia é considerada um mecanismo de morte celular (Galluzzi *et al.*, 2012).
- **Catástrofe mitótica:** O termo 'catástrofe mitótica' é restritamente utilizado na morte celular que ocorre durante a mitose. A definição proposta para caracterizar a catástrofe mitótica a coloca não como uma via indutora de morte celular, mas um mecanismo oncosupressor que inicialmente perturba a mitose durante o ciclo celular levando à morte celular ou à senescência (Galluzzi *et al.*, 2012).

#### 2.4. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

Muitos trabalhos têm demonstrado o envolvimento de EROs nos mecanismos de morte celular. O termo EROs surgiu na década de 1950 e em geral descreve espécies contendo oxigênio que são geradas durante o metabolismo celular (SHI *et al.*, 2004). O estresse oxidativo foi primeiramente definido por Helmut Sies em 1985, como sendo um desequilíbrio intracelular entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes. Entretanto, após mais de duas décadas de estudo na área, esse conceito foi atualizado por Dean P. Jones, que redefiniu o estresse oxidativo como sendo uma perturbação na sinalização e controle redox (JONES, 2006), a qual pode ser gerada pela excessiva produção de oxidantes ou ainda pela ineficiência das defesas antioxidantes

(LAU *et al.*, 2008). Devido a sua natureza altamente reativa, as EROs podem causar danos ao DNA, proteínas e lipídeos (THANNICKAL e FANBURG, 2000).

Em condições fisiológicas normais, existe um balanço extremamente controlado entre moléculas pró- e antioxidantes. As principais fontes endógenas de EROs como radical superóxido, oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila são provenientes de alguns processos do metabolismo celular, como fosfoliração oxidativa, reações catalisadas pelo sistema do citocromo P450, peroxissomos, NADPH oxidase, mieloperoxidase, xantina oxidase e inflamação (KUO, 2009; LAMBETH *et al.*, 2007).

O controle da homeostase do estado redox celular é realizado principalmente por glutathiona (GSH) e uma série de enzimas antioxidantes como: superóxido dismutase (SOD) (que catalisa a dismutação de  $O_2^{\cdot -}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$ ), catalase (que decompõe o peróxido de hidrogênio), glutathiona redutase (que reduz a glutathiona dissulfeto (GSSG) para a forma sulfidril (GSH)), glutathiona peroxidase (GPx) (que promove detoxificação de peróxidos), tioredoxina (Trx) (que reduz pontes dissulfeto), entre outras (KLAUNIG e KAMENDULIS, 2004; LAU *et al.*, 2008). Apesar de vários sistemas de defesa estarem envolvidos na manutenção do estado redox celular, em algumas situações, não são suficientes para equilibrar o sistema, sendo que nesses casos onde a formação de EROs é maior que a capacidade das defesas celulares, observamos um quadro de estresse oxidativo, o qual pode trazer várias conseqüências para o organismo (LAU *et al.*, 2008).

Em geral podemos dizer que baixos níveis de EROs podem promover proliferação celular, já em níveis intermediários podem causar uma transiente ou uma permanente parada de ciclo celular, ou senescência (Martindale e Holbrook, 2002). Em altos níveis de EROs ocorre a indução de morte celular por diferentes mecanismos (FINKEL e HOLBROOK, 2000; MARTINDALE e HOLBROOK, 2002). Mesmo que EROs apresentem um papel importante nos processos de morte celular via receptor de morte (WOO *et al.*, 2004), necroptosis (TU *et al.*, 2009), entre outros processos, o mecanismo apoptótico via mitocondrial é mais suscetível aos níveis de EROs (INDRAN *et al.*, 2011).

Foi descrito que EROs estão envolvidos na ativação de oncogenes, podendo levar à progressão tumoral e indução do processo de metástase de células tumorais (LAU *et al.*, 2008), visto que existe uma correlação entre um elevado nível de EROs em células tumorais comparado à células normais (BENHAR *et al.*, 2002). Entretanto, EROs também estão envolvidas na indução de morte em células tumorais em abordagens terapêuticas que geram um estresse oxidativo, como por exemplo: quimioterapia, radioterapia e terapia fotodinâmica (Reuter, Gupta *et al.*, 2010). Devido aos diferentes papéis desempenhados por EROs no meio intracelular, tanto o uso de antioxidantes, com o objetivo de diminuir a progressão tumoral causada por níveis elevados de EROs, bem

como o uso de pró-oxidantes, que tem como objetivo induzir uma morte celular via estresse oxidativo, tem sido estratégias úteis na terapia contra o câncer. Desta forma, o uso de agentes moduladores dos níveis de EROs tem aumentado consideravelmente (REUTER *et al.*, 2010; WANG e YI, 2008).

Recentemente foi demonstrado que os níveis de expressão do mRNA das enzimas antioxidantes é regulado pelo complexo Nrf2-Keap1 (LEONARDUZZI *et al.*, 2010). Nrf2 é um fator transcricional sensível ao equilíbrio redox celular, sendo a interação de Nrf2 com a proteína Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein*) controlada pelos níveis de GSH/GSSG (JONES, 2006). Normalmente a proteína Nrf2 está ligada com a proteína Keap1, sendo direcionada para degradação proteossomal. Entretanto, quando é gerado um estresse oxidativo por EROs, o complexo Nrf2-Keap1 se dissocia e Nrf2 é translocada para o núcleo onde se liga ao DNA na região ARE (*antioxidant response element*) (OSBURN e KENSLER, 2008), ativando a transcrição de algumas enzimas antioxidantes, como superóxido dismutases, glutationa S-transferase e catalase (ANTELMANN e HELMANN, 2011).

Dentre os vários moduladores da via envolvendo Nrf2, foi demonstrado que alguns flavonóides podem ativar a translocação nuclear de Nrf2 e conseqüentemente ativar a sequencia ARE em diferentes linhagens celulares (LEONARDUZZI *et al.*, 2010). Entretanto, também foi observado que a luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona), uma flavona hidroxilada, é capaz de induzir uma redução nos níveis de mRNA de Nrf2 e promover depleção de GSH em células da linhagem A549 (câncer de pulmão humano) (TANG *et al.*, 2011).

## 2.5. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A DROGAS

Um dos maiores obstáculos no uso de quimioterápicos para o tratamento do CHC é resistência ao tratamento por diferentes drogas, como o 5-fluorouracil (LI *et al.*, 2010), doxorubicina (GISH *et al.*, 2007), cisplatina (YEO *et al.*, 2005), entre outros. Entretanto, esta resistência ao tratamento por quimioterápicos não é uma particularidade do CHC e pode ser observado em diversos tipos de tumores como: melanoma, câncer de mama e de ovário, câncer do sistema nervoso central, leucemias, entre outros (TAMAKI *et al.*, 2011). Esse fenômeno de resistência é conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR). Quando se faz uso de um quimioterápico, o efeito desejado é que estes agentes promovam morte celular e regressão completa do tumor, porém, em muitos casos, as células tumorais não respondem dessa forma e desenvolvem o fenótipo de MDR, que pode ser mediado por: (i) mudanças nos níveis de expressão de proteínas alvos dos

agentes quimioterápicos, (ii) mutações que diminuem a atividade do quimioterápico, (iii) modificações do metabolismo e alteração da sinalização apoptótica, (iv) aumento na tolerância celular aos danos causados pelos quimioterápicos e principalmente, (v) diminuição no acúmulo intracelular do quimioterápico (HALL *et al.*, 2009). Esta redução no acúmulo intracelular da droga é atribuída a um aumento na expressão dos transportadores ABC (*ATP-Binding Cassete*), que utilizam ATP para catalisar o efluxo das drogas (JULIANO e LING, 1976; TAMAKI *et al.*, 2011).

### 2.5.1. Transportadores ABC

Os transportadores ABC constituem uma grande família de proteínas, sendo que mais de 2000 já foram identificadas (DASSA e BOUIGE, 2001). Esses transportadores foram descobertos primeiramente em bactérias nos anos 1950. Atualmente sabe-se que estão presentes em diferentes organismos como: arqueobactérias, procariotos e eucariotos (HIGGINS, 1992). Mesmo que nem todos os membros desta grande família estejam implicados no transporte de moléculas, a maior parte delas apresenta como principal função o transporte unidirecional de moléculas (chamadas de substratos), através de membranas biológicas (SAURIN *et al.*, 1999).

Dentre os 49 genes da família de transportadores ABC identificados no genoma humano, apenas 15 são descritos como transportadores de quimioterápicos em sistemas *in vitro* (DEAN *et al.*, 2001; JULIANO e LING, 1976). Dentre estes, apenas 3 transportadores ABC estão envolvidos diretamente na resistência a quimioterapia e apresentam uma forte relevância clínica, pois estão superexpressos em diversos tipos de tumores, como leucemias, câncer de mama, hepatoma, entre outros, acarretando em um mau prognóstico dos pacientes portadores desses tumores (SCHINKEL e JONKER, 2003). São eles: glicoproteína-P (P-gp, MDR1, codificada pelo gene *ABCB1*), *multidrug resistance associated protein-1* (MRP1, codificada pelo gene *ABCC1*) e *breast cancer resistance protein* (BCRP, MXR, ABCP, codificada pelo gene *ABCG2*).

Os transportadores ABC possuem alguns motivos comuns como o Walker A, Walker B e assinatura C (figura 6), responsáveis pela ligação de nucleotídeos em um domínio intracelular do transportador. A presença destes motivos sugere uma origem comum dos transportadores ABC, entretanto, as diferenças entre estes transportadores não é feita pela sua origem, mas pela sua função, uma vez que em procariotos apresentam tanto a função de importadores quanto exportadores, enquanto, que em eucariotos eles apenas tem função de exportadores (SAURIN *et al.*, 1999).

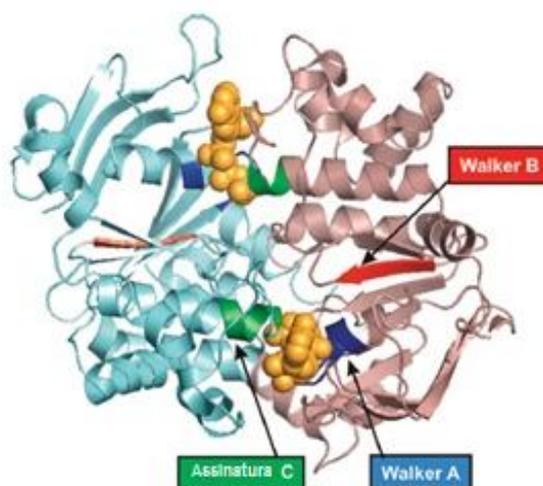


FIGURA 6 – HOMODÍMERO DE NBDs DESTACANDO OS MOTIVOS Walker A, Walker B E Assinatura C

FONTE: Adaptado (CIRCU e AW, 2010; ECKFORD e SHAROM, 2009).

NOTA: Esta estrutura de um homodímero de NBDs (domínios de ligação a nucleotídeos) que nos permite visualizar os motivos Walker A, Walker B e a assinatura C. Também é possível visualizar a posição do ATP (em laranja) entre os motivos Walker A e a assinatura C.

#### 2.5.1.1. Topologia dos transportadores ABC

Todos os membros da família de transportadores ABC apresentam uma topologia característica, apresentando um domínio transmembrana (TMD), ligado a um domínio de ligação a nucleotídeos (NBD) (figura 7A) (SCHNEIDER e HUNKE, 1998). Entretanto, os transportadores ABC estão organizados em diferentes formas: (i) como transportadores completos, com dois ou três domínios transmembrana, como é o caso da P-gp e MRP1, respectivamente (figura 7B), (ii) como meio-transportador, como no caso de ABCG2, que precisa formar um homodímero para constituir o transportador completo sendo capaz de promover o efluxo de drogas (Figura 7B).

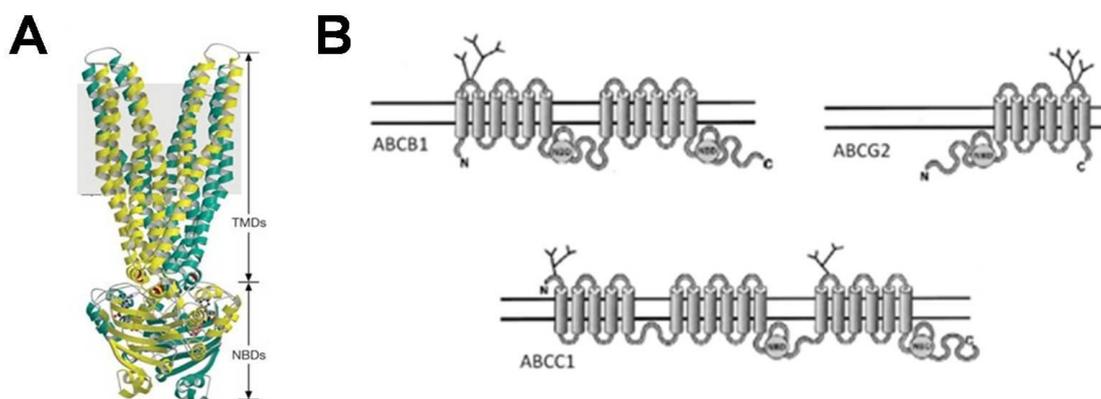


FIGURA 7 – ESTRUTURA TOPOLOGIA DOS TRANSPORTADORES ABC

FONTE: Adaptado (DAWSON e LOCHER, 2006; SCOTTO, 2003).

NOTA: (A) Estrutura do transportador Sav1866 de *S. aureus* cristalizado em sua forma funcional. Cada monômero (verde ou amarelo) é constituído de 6 braços transmembrana (TMDs) e 1 sítio de ligação a nucleotídeo (NBD). (B) Topologia dos transportadores abc (P-gp, Mrp1 e ABCG2).

#### 2.5.1.2. Funções dos transportadores ABC

Tanto P-gp como MRP1 e ABCG2 são capazes de transportar uma gama enorme de substratos. Normalmente os substratos são hidrofóbicos e não apresentam traços estruturais comuns para prever se a molécula será ou não transportada (ECKFORD e SHAROM, 2009). Também pode-se observar uma sobreposição de substratos que são transportados por mais de um transportador (tabela 3).

Além de transportarem uma grande quantidade de substratos (quimioterápicos, toxinas, lipídeos, outras drogas e etc.) através da membrana plasmática, os transportadores ABC apresentam importantes funções fisiológicas na detoxificação celular, protegendo o cérebro, fígado, rins e outros órgãos de substâncias nocivas, uma vez que nestes órgãos se observa um elevado nível de expressão de alguns transportadores ABC, principalmente P-gp e ABCG2 (SZAKACS *et al.*, 2006).

TABELA 3 – SUBSTRATOS DOS TRANSPORTADORES ABC (P-gp, MRP1 E ABCG2)

Classe	Substrato	P-gp	MRP1	ABCG2
Alcalóides da vinca	Vinblastina	Sim	Sim	Não
	Vincristina	Sim	Sim	Não
	Vinorelbina	Sim	Sim	Não
Antraciclinas	Daunorubicin	Sim	Sim	Sim
	Doxorubicin	Sim	Sim	Sim
	Epirubicin	Sim	Sim	Sim
Etipodofilotoxinas	Etoposídeo	Sim	Sim	Sim
	Teniposídeo	Sim	Não	Sim
Taxanos	Docetaxel	Sim	Não	Não
	Paclitaxel	Sim	Não	Não
Inibidores de quinases	Dasatinib	Sim	Sim	Sim
	Erlotinib	Sim	Não	Sim
	Geitinib	Sim	Não	Sim
	Imatinib (Gleevec)	Sim	Sim	Sim
	Lapatinib	Sim	Não	Sim
	Nilotinib	Sim	Sim	Sim
	Sorafenib	Sim	Não	Sim
	Sunitinib	Sim	Não	Sim
	Vandetanib	Não	Sim	Sim
Camptotecinas	Irinotecan (CPT-11)	Sim	Sim	Sim
	SN-38	Sim	Sim	Sim
	Arsenito	Não	Sim	Não
	AZT	Não	Não	Sim
	Bisantrene	Sim	Não	Sim
	Cisplatina	Não	Sim	Não
	Colchicina	Sim	Sim	Não
	Digoxina	Sim	Não	Não
	Flavopiridol	Não	Não	Sim
	Metotrexato	Sim	Sim	Sim
	Mitoxantrona	Sim	Não	Sim
	Saquinivir	Sim	Não	Não

FONTE: Adaptado Tamaki *et al.*, (2011).

### 2.5.1.3. P-gp

Dentre os três transportadores ABC citados, o primeiro a ser descoberto e melhor caracterizado é a proteína P-gp. Em 1976, Juliano e Ling demonstraram que a proteína P-gp era responsável pelo fenótipo de resistência a drogas em células tumorais resistentes a quimioterapia, sendo um transportador capaz de transportar uma grande quantidade de substratos de classes químicas completamente diferentes, como drogas hidrofóbicas (colchicina, vinblastina, doxorubicina e etc.) e também lipídeos, xenobióticos e peptídeos. A proteína P-gp também apresenta uma importante função fisiológica em células normais, sendo responsável pela remoção de metabólitos tóxicos (SCHINKEL *et al.*, 1994).

Por apresentar funções de proteção celular, a proteína P-gp encontra-se expressa em diferentes tecidos do organismo, principalmente nos quais apresentam função de secreção, estando localizada normalmente na membrana apical de células epiteliais (THIEBAUT *et al.*, 1987). A proteína P-gp possui 1280 aminoácidos que conferem uma

massa molecular de 170 KDa, possui 2 domínios transmembrana (TMDs) e 2 domínios de ligação a nucleotídeo (NBDs), como mostrado na figura 8 (ALLER *et al.*, 2009). Também vale a pena ressaltar que, até o momento, dentre os três transportadores envolvidos na resistência a quimioterapia, a proteína P-gp é o único transportador cuja estrutura já foi elucidada (TAMAKI *et al.*, 2011).

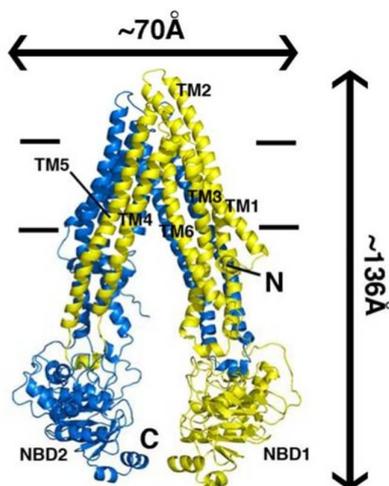


FIGURA 8 – ESTRUTURA DA P-gp

FONTE: Adaptado (ALLER *et al.*, 2009).

NOTA: (A) Estrutura da P-gp resolvida a 3.8 angstroms por cristalografia.

#### 2.5.1.4. MRP1

O gene *ABCC1* que codifica para a proteína MRP1, foi identificado por Cole e colaboradores em 1992 na linhagem celular NCI-H69 (*small-cell lung carcinoma*) (COLE *et al.*, 1992). Embora a estrutura de MRP1 ainda não tenha sido resolvida, o modelo topológico é formado por 2 TMDs (TMD1 e TMD2), 2 NBDs e um terceiro TMD chamado TMD0 (NH<sub>2</sub>-terminal) (figura 7B) (DEGORTER *et al.*, 2008). Como os outros transportadores ABC, MRP1 é amplamente distribuído em diferentes órgãos, sendo encontrado principalmente no fígado, rins, intestino, cérebro, entre outros (LESLIE *et al.*, 2005).

MRP1 é capaz de transportar vários quimioterápicos, como no caso da P-gp (doxorubicina, colchicina e etc.) e substratos endógenos, como é o caso de leucotrienos (DEELEY e COLE, 2006). Entretanto, a principal característica que diferencia MRP1 da P-gp é a sua capacidade de transportar glutatona (GSH) na forma livre, bem como glutatona na forma conjugada (BORST *et al.*, 2000). Mesmo apresentando similaridades entre os substratos, existem poucos inibidores que são capazes de reverter o fenótipo de MDR em células superexpressando MRP1, ou seja, até o momento existem poucos compostos capazes de modular a atividade de MRP1, contrariamente a P-gp, onde

inibidores já estão sendo usados em testes clínicos, devido a sua alta eficiência *in vitro* (TAMAKI *et al.*, 2011).

#### 2.5.1.5. ABCG2

O transportador ABC pertencente a subfamília G, ABCG2 foi o transportador envolvido na resistência a quimioterapia descoberto mais recentemente. Três laboratórios independentes foram responsáveis por identificá-lo e o nomearam de acordo com o modelo utilizado. Doyle e colaboradores em 1998 identificaram que células de câncer de mama MCF-7/AdrVp que não expressavam P-gp e MRP1, apresentavam resistência a quimioterapia, nomeando a nova proteína responsável como BCRP, devido ao fato de promover resistência em células de câncer de mama (*breast cancer resistance protein*) (DOYLE *et al.*, 1998). Dois outros grupos identificaram duas proteínas com seqüência quase idêntica ao mesmo tempo, e a chamaram de MXR, pois foi identificada em uma linhagem de células de carcinoma de cólon humano (S1-M1-80), que era resistente a mitoxantrona (MXR) (MIYAKE *et al.*, 1999) e ABCP, devido a sua presença na placenta (ALLIKMETS *et al.*, 1998).

ABCG2 é uma glicoproteína de 655 aminoácidos conferindo a esta molécula uma massa de 72 KDa (SARKADI *et al.*, 2004). Como citado anteriormente, ABCG2 é um meio-transportador, ou seja, precisa se dimerizar para formar a estrutura ativa. ABCG2 apresenta funções fisiológicas importantes e é capaz de transportar uma grande quantidade de substratos (mitoxantrona, topotecan, SN-38 entre outros) (BOUMENDJEL *et al.*, 2011). É encontrado principalmente em tecidos excretórios, como no fígado e rins (VLAMING *et al.*, 2009). Usando o anticorpo monoclonal BXP-21, foi demonstrado que ABCG2 está presente em diversos tipos de tumores sólidos, com particular abundância em tumores do trato digestivo, endométrio e melanoma (DIESTRA *et al.*, 2002), entretanto, seu papel na resistência a quimioterapia é melhor evidenciado em leucemias (GALIMBERTI *et al.*, 2004). ABCG2 também é expresso em células tronco hematopoiéticas onde serve como um marcador de uma população de células chamada *side-population* (SP), que serve para distinguir uma sub-população de células marcadas (SCHARENBERG *et al.*, 2002). Destaca-se que ABCG2 é capaz de transportar GSH na forma livre, assim como MRP1 (BRECHBUHL *et al.*, 2010). Em resumo, os três transportadores que apresentam relevância clínica para o fenótipo de resistência à quimioterapia apresentam particularidades ao nível de transporte, entretanto, não se observa uma relação estrutural entre os substratos transportados.

### 2.5.1.6. Uso de inibidores dos transportadores ABC

O método mais simples e direto para reverter à resistência causada pelos transportadores ABC, é bloquear o transporte de substratos através do uso de inibidores. Muitos laboratórios estão trabalhando na busca de novos inibidores, alguns destes inibidores foram listados na tabela 4, sendo que algumas características são cruciais para o desenvolvimento de novos inibidores, como: (i) alta afinidade pelo transportador, resultando em eficácia a baixas concentrações, (ii) específico para apenas um transportador, (iii) sem interação farmacocinética com os quimioterápicos, (iv) não ser transportado e (v) baixa toxicidade (BOUMENDJEL *et al.*, 2011).

TABELA 4 – INIBIDORES DOS TRANSPORTADORES ABC (P-gp, MRP1 E ABCG2)

Inibidor	P-gp	MRP1	ABCG2
Amiodarona	Sim	Não	Não
Cyclosporina A	Sim	Sim	Sim
Nifedipina	Sim	Não	Não
Quinidina	Sim	Sim	Não
Quinina	Sim	Sim	Não
Verapamil	Sim	Sim	Não
Biricodar (VX-710)	Sim	Sim	Sim
Dexniguldipina	Sim	Não	Não
Dofequidar (MS209)	Sim	Sim	Não
S9788	Sim	Não	Não
Valspodar (PSC-33)	Sim	Não	Não
CBT-1	Sim	Sim	Não
Elacridar (GF120918)	Sim	Não	Sim
Laniquidar (R101933)	Sim	Não	Não
LY475776	Sim	Sim	Não
ONT-093	Sim	Não	Não
Tariquidar (XR-9576)	Sim	Não	Sim
Zosuquidar (LY335979)	Sim	Não	Não
Curcumina	Não	Sim	Sim
Flavonóides	Não	Sim	Sim
FTC	Não	Não	Sim
Mitotane	Sim	Não	Não
MK571	Não	Sim	Não

FONTE: Adaptado Tamaki *et al.*, (2011).

Alguns autores questionam o uso de inibidores dos transportadores ABC na clínica devido a suas importantes funções fisiológicas. Entretanto, isso não é uma particularidade de inibidores de transportadores ABC, uma vez que para a grande maioria dos novos fármacos é necessário avaliar seu custo-benefício antes de seu uso clínico (ROBERT e JARRY, 2003). Como normalmente as funções fisiológicas de um transportador ABC também são realizadas por outros transportadores da mesma família devido as suas similaridades estruturais, o bloqueio de um transportador específico envolvido diretamente com a resistência ao quimioterápico, em um dado paciente, não

comprometeria as funções fisiológicas normais dos outros transportadores. Porém, para isso acontecer, torna-se importante identificar inibidores específicos para cada transportador e, juntamente, identificar em cada paciente quais os transportadores estão superexpressos, para tentar ser o mais preciso possível na escolha das drogas a serem utilizadas no protocolo clínico.

A utilização de inibidores para a proteína P-gp (descoberta a mais de 35 anos) já chegou à fase clínica. Os inibidores de P-gp são divididos em três gerações: a 1<sup>o</sup> geração de inibidores foram drogas aprovadas pelo FDA, como o verapamil, quinidina e cyclosporina A (LIST *et al.*, 2001). Esses inibidores apresentaram bons resultados *in vitro*, porém, na clínica foi observada uma baixa eficácia, mesmo assim, os resultados foram promissores. Essa baixa eficácia foi devido à impossibilidade de aumentar as doses requeridas para bloquear o transporte, pois essas drogas possuem outros alvos celulares em concentrações menores, levando a efeitos adversos (TAMAKI *et al.*, 2011). Para contornar esses problemas, passou-se a trabalhar em uma 2<sup>o</sup> geração de inibidores, com uma maior afinidade para P-gp e com menos efeitos colaterais. Dessa 2<sup>o</sup> geração podemos destacar o elacridar (GF120918), valspodar (PSC-833) e o biricodar (VX-710) (KOLITZ *et al.*, 2004). Infelizmente estes inibidores interferem com a biodisponibilidade dos quimioterápicos por inibirem enzimas do citocromo P450, acarretando na interrupção dos testes clínicos (BAER *et al.*, 2002). A 3<sup>o</sup> geração de inibidores conseguiu contornar todos os problemas, sendo então inibidores potentes, não tóxicos e sem interação farmacocinética com o quimioterápico. Esses inibidores começaram a ser testados a partir de 2007 e temos como exemplos o tariquidar (XR9576), zosuquidar (LY335979), laniquidar (R1011933), CBT-1 e Dofequidar (MS-209) (CRIPE *et al.*, 2010; SAEKI *et al.*, 2007). Entretanto, os resultados não foram os esperados e na grande maioria dos casos, o grupo tratado com um inibidor de P-gp não apresentou diferença do grupo placebo, abrindo questionamentos em duas vertentes: (i) pesquisadores que desacreditam na estratégia de utilizar um inibidor do transportador em conjunto ao quimioterápico, pois acreditam que outros mecanismos de resistência mais importantes estão presentes, (ii) pesquisadores que acreditam na estratégia e questionam os ensaios clínicos realizados até o momento, principalmente porque o nível de expressão de P-gp não foi monitorado nem a presença de ABCG2 e MRP1 nos mesmos pacientes, resultando possivelmente no transporte do quimioterápico utilizado por outros transportadores (TAMAKI *et al.*, 2011). Uma vez que ABCG2 está superexpresso na maioria dos pacientes que também apresentam níveis elevados de P-gp, surge à necessidade de inibidores específicos de ABCG2 para futuros ensaios clínicos.

### 2.5.1.6.1. Uso de inibidores de ABCG2

Os inibidores de ABCG2 podem ser divididos em dois tipos: inibidores específicos, como a fumitremorgin C (FTC) (figura 9) ou inibidores não específicos, como o GF120918 (figura 9), que inibe tanto ABCG2 quanto P-gp (NICOLLE *et al.*, 2009b). O primeiro inibidor específico de ABCG2 identificado foi o FTC, isolado de *Aspergillus fumigatus Fresenius*, sendo capaz de inibir o transporte de mitoxantrona, doxorubicina e topotecan em células S1-M1-3.2 e MCF7/ABCG2 (RABINDRAN *et al.*, 1998; RABINDRAN *et al.*, 2000). Entretanto, o FTC mostrou-se neurotóxico, promovendo tremores e convulsões em camundongos, o que impossibilitou a continuação dos testes em ensaios clínicos (BOUMENDJEL *et al.*, 2011).

Novos inibidores de ABCG2 surgiram, como é o caso do Ko143 (figura 9), um análogo do FTC, com a vantagem de não apresentar toxicidade, porém, não são completamente seletivos para ABCG2, mas possuem uma alta afinidade pelo transportador quando comparado a P-gp e MRP1 (BOUMENDJEL *et al.*, 2011). O Ko143 é um dos inibidores de ABCG2 mais utilizados em modelos celulares, devido a sua maior afinidade por ABCG2. Também foi demonstrado que além de bloquear o transporte de substratos, Ko143 é capaz de inibir a atividade ATPase de ABCG2 (ALLEN *et al.*, 2002).

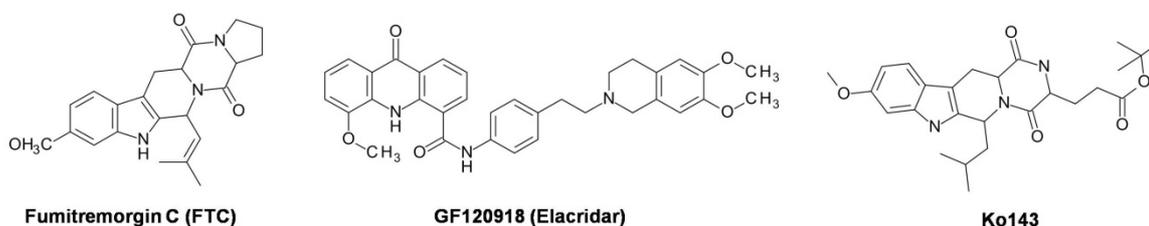


FIGURA 9 – ESTRUTURA DO FTC, GF120918 E Ko 143  
 FONTE: O Autor 2012.

Outras classes de inibidores de ABCG2 já foram descritas, como os taxóides, derivados do elacridar (GF120918), derivados do tariquidar, rotenóides, xantonas, chalconas, entre várias outras (BOUMENDJEL *et al.*, 2011). Uma classe de inibidores de ABCG2 que recentemente tem ganhado atenção é representada pelos inibidores de tirosina quinases, porém estes compostos não são específicos e interagem também com P-gp e MRP1 (HEGEDUS *et al.*, 2002b; HEGEDUS *et al.*, 2002a ; SHUKLA *et al.*, 2008a; SHUKLA *et al.*, 2008b). Vários destes inibidores são também substratos dos transportadores ABC, ou seja, são transportados e provavelmente bloqueiam o transporte de outros substratos por competição entre eles. De fato, muita controvérsia existe quanto

ao mecanismo de ação dos inibidores de quinases sobre o transportador ABCG2, como por exemplo, o imatinib, que é descrito como substrato (BRENDDEL *et al.*, 2007; BURGER *et al.*, 2004a; NAKANISHI *et al.*, 2006), inibidor (HOUGHTON *et al.*, 2004; JORDANIDES *et al.*, 2006) e ainda alguns autores sugerem que ele não é transportado quando utilizado em baixa concentração (SHUKLA *et al.*, 2008b). Esse mecanismo controverso não é uma particularidade do imatinib, mas ocorre também com o gefitinib e outros (ELKIND *et al.*, 2005).

Muitos autores têm reportado o efeito inibidor de transportadores ABC por compostos provenientes de plantas, que seriam promissores devido a sua abundância e facilidade na obtenção. Podemos citar como um dos principais exemplos a curcumina, identificado primeiramente como inibidor de P-gp (CHEARWAE *et al.*, 2004) e posteriormente como inibidor de ABCG2 e MRP1 (CHEARWAE *et al.*, 2006). Entretanto, a curcumina é rapidamente metabolizada em um subproduto menos ativo, impedindo seu uso na clínica (BOUMENDJEL *et al.*, 2011).

Compostos polifenólicos também são capazes de inibir o transporte de substratos pela P-gp e MRP1, apresentando uma relação estrutura-atividade distinta dependendo do transportador (NICOLLE *et al.*, 2009b). Os primeiros trabalhos que mostraram inibição de ABCG2 por polifenóis datam de 2004, porém, apresentaram uma baixa afinidade, ou seja, as concentrações utilizadas para inibição apresentam-se em torno de 30  $\mu\text{M}$  (COORAY *et al.*, 2004). No mesmo ano também foi demonstrado que flavonóides como a crisina e a biochanina A também são capazes de inibir ABCG2 e que a subclasse das flavonas apresentou maior potencial (flavonas > flavonóis > isoflavonas > flavanonas) (ZHANG *et al.*, 2004). No ano seguinte foi identificado que a flavona 6-prenilcrisina é um potente inibidor de ABCG2, apresentando um  $\text{IC}_{50}$  de 0,3  $\mu\text{M}$  (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005b).

Ainda não há dados clínicos do uso de inibidores de ABCG2, também sabe-se da necessidade de melhorar os testes clínicos utilizando inibidores dos transportadores ABC para validar a estratégia. O ideal seria identificar em cada paciente qual tipo de transportador está envolvido com a resistência, monitorar a expressão do mesmo e fazer um estudo comparativo com o uso do inibidor *versus* placebo, para posteriormente confirmar as especulações hoje existentes. Testes clínicos são muito mais complexos que os estudos em modelos *in vitro* e *in vivo*, entretanto, para ABCG2 ainda não existem excelentes inibidores com potencial de uso clínico como no caso da P-gp, tornando-se de extrema importância identificar inibidores que não apresentem citotoxicidade, não sejam transportados, apresentem uma alta afinidade e ainda sejam seletivos para esse transportador.

## 2.6. FLAVONÓIDES

Vários compostos polifenólicos são encontrados em plantas, entre eles podemos citar os flavonóides, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, ligninas e quinonas (CAI *et al.*, 2006). Cerca de mais de 6000 flavonóides já foram identificados. Os flavonóides fazem parte do metabolismo secundário das plantas, sendo encontrados em várias partes destas, como: folhas, raiz, caule e etc. Nas plantas os flavonóides estão envolvidos na pigmentação e também são fatores de grande importância no crescimento, desenvolvimento e imunidade, também podendo atuar como antioxidantes e sinalizadores intracelulares (HARBORNE e WILLIAMS, 2000; TREUTTER, 2006).

### 2.6.1 Classificação dos flavonóides

A estrutura dos flavonóides é baseada em dois anéis benzênicos (A e B), os quais podem, ou não, estar conectados por um terceiro anel (C), um anel pirano contendo oxigênio. A figura 10 representa um exemplo de flavonóide com anel C (ERLUND, 2004).

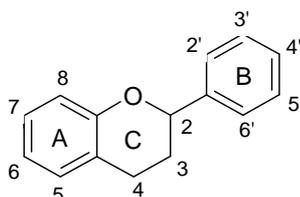


FIGURA 10 - ESTRUTURA DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C

A partir deste anel base, várias combinações estruturais aparecem principalmente com a distribuição de grupos hidroxí e metoxi em sua estrutura. Os flavonóides podem ainda ser encontrados de duas formas: sem grupamentos açúcar (agliconas) ou com resíduos de açúcares ligados (glicosídicas) (PETERSON e DWYER, 1998). Flavonóides podem ser classificados em diferentes classes (flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanonóis, flavans, flavanóis, chalconas, dihidrochalconas, flavan-3,4-dióis e antocianidinas) de acordo com a natureza e distribuição dos substituintes, grau de insaturação e conexão do anel C (CORRADINI *et al.*, 2011). A estrutura base de cada uma destas classes está representada na figura 11.

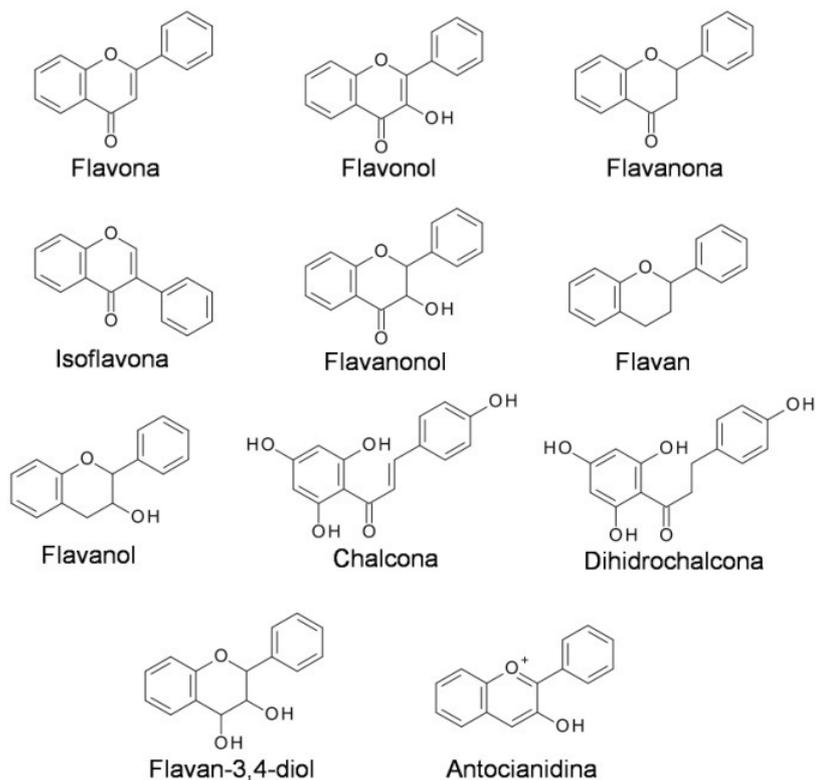


FIGURA 11 – ESTRUTURA DAS DIFERENTES CLASSES DE FLAVONÓIDES  
 FONTE: Adaptado (CORRADINI *et al.*, 2011).

### 2.6.2. Atividades biológicas dos flavonóides e relação estrutura-atividade

Entre as várias atividades biológicas descritas para os flavonóides podemos destacar: antioxidante (MONTORO *et al.*, 2005), anti-inflamatória (MIDDLETON *et al.*, 2000), inibidora de transportadores ABC (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005a), antitumoral (SANJEEV SHUKLA, 2008; SHUKLA e GUPTA, 2010), entre várias outras.

Estudos epidemiológicos têm apontado que o consumo de frutas e verduras que contém flavonóides reduz o risco de vários tipos de tumores e outras doenças crônicas (BLOCK *et al.*, 1992; WATTENBERG, 1997). O risco de incidência de câncer em pessoas que possuem uma dieta pobre em frutas e verduras pode chegar a ser duas vezes maior, quando comparado a pessoas com uma dieta rica em frutas e verduras (HERTOG *et al.*, 1993; KNEKT *et al.*, 1997).

Os efeitos antioxidantes foram os primeiros efeitos estudados dos flavonóides. Este efeito antioxidante demonstrado por alguns flavonóides aumentou o interesse de muitos pesquisadores, devido à associação da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio com o desenvolvimento de várias doenças, entre elas o câncer (BRAVO, 1998).

Com o aparecimento de novos trabalhos envolvendo flavonóides, descobriu-se que essas moléculas podem atuar também como pró-oxidantes, apresentando atividades citotóxicas e carcinogênicas. O radical hidroxila gerado nos processos de auto-oxidação e ciclo redox dos flavonóides pode desencadear a peroxidação lipídica em membranas celulares, podendo assim induzir indiretamente o estresse oxidativo celular. Propriedades antioxidantes ou pró-oxidantes proporcionadas por flavonóides dependem tanto da concentração usada quanto da sua estrutura (UEDA *et al.*, 2002).

A configuração dos substituintes hidroxí no anel-B é determinante para a atividade sequestradora de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (CAO *et al.*, 1997). A capacidade sequestradora de radical superóxido dos flavonóides é dependente do número de grupos hidroxí e da posição destes grupos no anel B e também da presença de um grupo hidroxí no carbono 3 do anel C (HU *et al.*, 1995). Outra característica estrutural importante de alguns flavonóides é a presença da dupla ligação entre C2 e C3 e o grupo carbonila em C4, responsável por promover um aumento na atividade antioxidante destes compostos (BORS *et al.*, 1990).

A atividade pró-oxidante promovida pelos flavonóides é também proporcional ao número de grupos hidroxí presentes nestes compostos (CAO *et al.*, 1997). Estes efeitos pró-oxidantes são responsáveis por efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos promovidos por vários flavonóides presentes em ervas medicinais (ISMAIL e ALAM, 2001; UEDA *et al.*, 2002).

Existe um grande interesse a respeito dos flavonóides e sua aplicação na prevenção e tratamento do câncer, doenças cardiovasculares e outras patologias (RICE-EVANS, 2001). Os flavonóides também interagem com enzimas do citocromo P450 (CYPs), glicoproteína P (P-gp) e enzimas de fase II que estão envolvidas na metabolização de drogas. Podem também inibir ou ativar a atividade das CYPs, dependendo da estrutura, concentração e condições experimentais que são utilizadas (KALE *et al.*, 2008).

O grupo de pesquisa do Dr. Attilio Di Pietro demonstrou em 2005 que as flavonas são inibidores do transporte de mitoxantrona em células que superexpressam ABCG2. Foi demonstrado que a ordem de eficácia entre as classes dos flavonóides foi: flavonas (apigenina) > flavonóis (galangina) > isoflavonas (genisteína) > flavononas (naringenina) (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005b). Neste mesmo trabalho, também foram identificadas duas flavonas como potentes inibidores específicos de ABCG2, a tectocrisina e a 6-prenilcrisina. A 6-prenilcrisina (6-PC), apresentou um IC<sub>50</sub> de 0,33 µM, valor comparável ao do GF120918, um dos inibidores de referência de ABCG2, porém não seletivo (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005b).

Alguns flavonóides pertencentes às classes das flavonas, flavonóis, flavanonas e isoflavonas, possuem efeitos antiproliferativos em diferentes linhagens de células tumorais (KUNTZ *et al.*, 1999; SHUKLA e GUPTA, 2010). A atividade antitumoral de vários flavonóides, como a exemplo da quercetina e miricetina, em alguns casos é atribuída a sua eficiência em inibir as enzimas topoisomerases I e II (SUKARDIMAN *et al.*, 2000). Alguns flavonóides podem atuar diminuindo a proliferação celular como consequência de sua ligação ao receptor de estrógeno (PRIMIANO *et al.*, 2001). Flavonóides também apresentam atividade inibidora de proteínas quinases (GAMET-PAYRASTRE *et al.*, 1999).

Muitos trabalhos envolvendo atividades biológicas de flavonóides surgiram a partir dos anos 90 e na última década o número de trabalhos relacionados com o efeito de flavonóides em células tumorais aumentou consideravelmente. A tabela 5 resume uma pequena parte dos trabalhos mostrando a atividade de duas importantes classes de flavonóides (flavonóis e flavonas), frente a várias linhagens celulares.

TABELA 5 – EFEITO DE FLAVONÓIDES FRENTE A VÁRIAS LINHAGENS CELULARES

Flavonóides	Classes	Dose/Tempo	Linhagem celular	Atividades	Autores
Quercetina	Flavonóis	20 $\mu$ M por 72h	HL-60	↓ 50 % proliferação Indução de apoptose Atividade antioxidante	(RUSAK <i>et al.</i> , 2005)
Mirecetina		35 $\mu$ M por 72h			
Kaempferol		42 $\mu$ M por 72h			
Isoramnetina		25 $\mu$ M por 72h			
Luteolina	Flavonas	50 $\mu$ M por 24h	CH27	Induziu apoptose Danos ao DNA	(LEUNG <i>et al.</i> , 2005)
				Induziu a apoptose ↑ expressão de SOD e catalase	(LEUNG <i>et al.</i> , 2006)
		80 $\mu$ M por 18h	HepG2	Induziu apoptose Induziu a liberação de citocromo c	(LEE <i>et al.</i> , 2005)
		100 $\mu$ M por 24h	H411E	Induziu a apoptose Ativação de caspases	(MICHELS <i>et al.</i> , 2005)
Crisina		25 $\mu$ M por 24h	CRL-2301	↓ proliferação ~ 60%	(TSUJI e WALLE, 2008)
Oroxilina A		230 $\mu$ M por 24h	HepG2	↓ 50% proliferação Induziu apoptose	(HU <i>et al.</i> , 2006)
Wogonina		50 $\mu$ M por 24h	LNCaP	↓ 50% da viabilidade Induz apoptose via p53 Ativação de caspases	(LEE <i>et al.</i> , 2008)

Tabela 5 – Efeito de flavonóides frente à várias linhagens celulares (continuação)

Flavonóides	Classes	Dose/Tempo	Linhagem celular	Atividades	Autores
Apigenina	Flavonas	100 µM por 96h	A549, MCF7,	↓ proliferação ~ 30%	(VARGO <i>et al.</i> , 2006)
		100 µM por 96h	THP-1, U937, Jurkat, K562	↓ proliferação ~ 80%	
		10 µM por 48h	CA-HPV-10	Parada de ciclo em G2-M Indução de apoptose	(GUPTA <i>et al.</i> , 2001)
		50 µM por 48h	LNCaP e PWR-1E	Indução de apoptose dependente de caspases Liberação de citocromo <i>c</i> Aumento na produção de EROs	(MORRISSEY <i>et al.</i> , 2005)
		80 µM por 48h	SW480, HT-29 e Caco-2	Parada de ciclo em G2-M Diminuiu a expressão de p34 e ciclina B1	(WANG <i>et al.</i> , 2000)
		40 µM por 48h	MDA-MB-453	↓ proliferação Inibe AKT e PI3K	(WAY <i>et al.</i> , 2004)
		60 µM por 12h	HL-60	Indução de apoptose Liberação de citocromo <i>c</i> Ativação de caspase Aumento de EROs	(WANG <i>et al.</i> , 1999)
		37 µM por 24h	HeLa	↓ viabilidade ~ 50% Indução de apoptose Aumento de p53	(ZHENG <i>et al.</i> , 2005)
		120 µM por 24h	A549	Indução de apoptose Ativação de casapases Liberação de citocromo <i>c</i>	(LU <i>et al.</i> , 2010)

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: HL-60, Leucemia aguda humana; HMC-1, Leucemia mastocítica humana; CH27, Células de carcinoma escamoso de pulmão humano; HepG2, hepatoma humano; A549, Câncer de pulmão humano; MCF7, Células de câncer de mama humano; THP-1, Leucemia humana aguda monocítica; U937, Linhagem leucêmica de células monocíticas; Jurkat, Leucemia linfóide aguda; K562, Leucemia mielóide crônica; LNCaP, Carcinoma de próstata; HT-29, Carcinoma de cólon humano; HeLa, Carcinoma cervical humano; MDA-MB-361, Carcinoma de mama; MDA-MB-468, Carcinoma de mama humana; BT20, Carcinoma de mama.

Na sequência são apresentadas algumas informações mais detalhadas sobre os diferentes flavonóides usados ao longo deste trabalho.

### 2.6.2.1. Flavonas

Na figura 12 são apresentadas as estruturas químicas das três flavonas utilizadas neste trabalho.

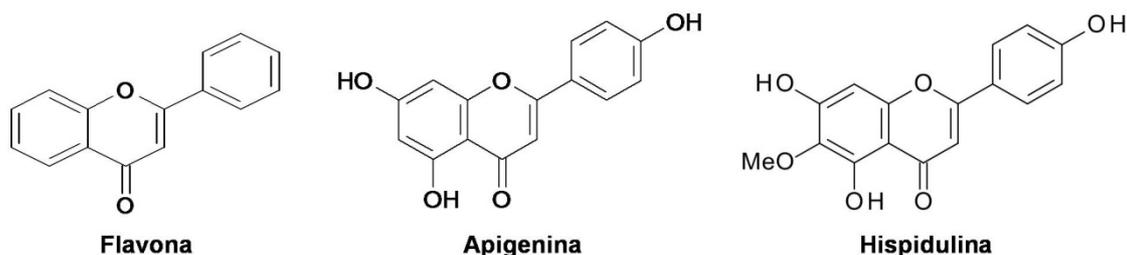


FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DA FLAVONA, APIGENINA E HISPIDULINA  
 FONTE: O Autor (2012).

#### 2.6.2.1.1. Flavona

A flavona (2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona) (figura 12) é o composto contendo apenas o anel base desta classe de flavonóides, não apresentando nenhum substituinte em sua estrutura, sendo encontrada em várias plantas como o endro e grãos de cereais (MARTENS e MITHOFER, 2006). Os efeitos da flavona sobre células tumorais foram pouco explorados até o momento, em comparação com flavonas hidroxiladas. Wenzel *et al.*, (2000) demonstrou que o tratamento das células HT-29 (câncer de cólon humano) com a flavona (na dose de 150  $\mu$ M, por 24 horas) diminui a proliferação celular e induz apoptose. Bai *et al.*, (1998) mostraram que o tratamento de células A549 (adenocarcinoma de pulmão) com flavona (na dose de 100  $\mu$ M) aumenta a expressão da proteína p21 e promove parada de ciclo celular em G2M. Ullmannova e Popescu (2007) também mostraram que o tratamento de diferentes linhagens de câncer de mama com flavona (na dose de 150  $\mu$ M) promove alterações na expressão de genes envolvidos com a regulação da progressão tumoral, ciclo celular e o processo de apoptose. Além disso, em um estudo recente de nosso laboratório usando mitocôndrias isoladas de fígado de rato, foi mostrado que a flavona afeta o potencial de membrana mitocondrial, reduz a velocidade respiratória do estado 3 e inibe a atividade de enzimas da cadeia respiratória (VALDAMERI *et al.*, 2010). Esses resultados sugerem que a mitocôndria pode ser um dos alvos da flavona em modelos celulares.

#### 2.6.2.1.2. Apigenina

A apigenina (5,7,4'-triidroxi-flavona) (figura 12) é outro representante das flavonas, sendo encontrada em várias frutas e verduras, como cebola, salsa, laranja, chás, camomila e ainda em alguns temperos (DUTHIE *et al.*, 2000). A apigenina é um dos flavonóides mais estudados e apresenta vários efeitos biológicos, incluindo a atividade antiinflamatória, antitumoral, propriedade de seqüestrar radicais livres em sistemas *in vitro* entre outras (SHUKLA e GUPTA, 2010). Alguns dos efeitos da apigenina frente a diferentes linhagens celulares foram descritos anteriormente na tabela 5.

Chiang e colaboradores (2006) compararam o efeito da apigenina em células de hepatoma humano (HepG2) com uma linhagem de hepatócitos normais e concluíram que a apigenina possui um efeito mais seletivo que o quimioterápico 5-Fluoracil, que é utilizado no tratamento do CHC. Esse efeito seletivo apresentado pela apigenina não foi observado apenas em células de hepatocarcinoma, mas também em células de câncer de próstata (GUPTA *et al.*, 2001), entretando, o mecanismo pelo qual a apigenina apresenta efeito seletivo em células tumorais, ou mesmo o mecanismo de indução de morte celular ainda não foi completamente elucidado. Também foi observado que o tratamento de células HepG2 com 20  $\mu$ M de apigenina por 48 horas promove indução de apoptose devido ao aumento na produção de EROs (CHOI *et al.*, 2007).

#### 2.6.2.1.3. Hispidulina

A hispidulina (5,7,4'-triidroxi-6-metoxiflavona) (figura 12) é um representante das flavonas encontrado em folhas de *Eupatorium litorale*. Em um trabalho realizado em nosso laboratório, foi observado que a hispidulina atua como desacoplador da fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e também é capaz de liberar ferro da ferritina (DABAGHI-BARBOSA *et al.*, 2005). Foi observado que o tratamento de células de glioblastoma multiforme com hispidulina causa parada de ciclo celular em G1 e induz apoptose através de um aumento na expressão das proteínas p53 e p21 (LIN *et al.*, 2010). Recentemente, a hispidulina foi descrita por induzir apoptose via receptor TRAIL, ativar caspases-8 e -3 em células de câncer de ovário humano (YANG *et al.*, 2010) e inibir o crescimento de células de tumor de pâncreas humano em um modelo xenográfico (HE *et al.*, 2011).

Recentemente, em nosso laboratório foi demonstrado que o tratamento de células HepG2 com hispidulina é capaz de diminuir a viabilidade celular de maneira tempo e dose dependente, e que esse efeito foi acompanhado de aumento nos níveis de EROs, diminuição nos níveis de GSH intracelular, assim como diminuição nos níveis de expressão no mRNA da catalase (SCOPARO, 2012).

#### 2.6.2.2. Flavonóis

A morina (3,5,7,2',4'-pentahidroxi flavona) (figura 13), é o representante dos flavonóis, encontrado em membros da família Morácea (ex: acelga) e em outras plantas. Entre os efeitos já observados para este flavonóide destacam-se atividade anti-inflamatória e antitumoral (KUO *et al.*, 2007; OCETE *et al.*, 1998). O tratamento de células HMC-1 (leucemia mastocítica humana) com 100  $\mu\text{M}$  de morina por 96 horas promove redução de ~20% na viabilidade celular (ALEXANDRAKIS *et al.*, 2003). Foi observado que o tratamento de células HL-60 (leucemia aguda humana) com elevada concentração de morina (400  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas promove parada de ciclo em G2M, induz apoptose e reduz o potencial de membrana (KUO *et al.*, 2007). A morina também possui capacidade inibidora de enzimas do citocromo P450 e foi descrita como inibidora de P-gp (LEE *et al.*, 1998), aumentando o acúmulo de daunomicina em células que superexpressam este transportador (CHUNG *et al.*, 2005).

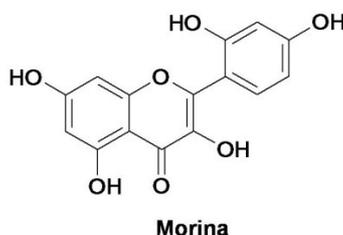


FIGURA 13 – ESTRUTURA QUÍMICA DA MORINA  
FONTE: O Autor (2012).

#### 2.6.2.3. Chalconas

As chalconas (figura 14), são polifenóis derivados de plantas caracterizadas por alguns autores como precursores dos flavonóides e isoflavonóides (KATSORI e HADJIPAVLOU-LITINA, 2011), entretanto, outros autores classificam as chalconas como uma classe de flavonóides (CORRADINI *et al.*, 2011). Várias atividades biológicas das chalconas já foram descritas, incluindo atividade antibacteriana

(TSUKIYAMA *et al.*, 2002), antioxidante (CALLISTE *et al.*, 2001), antileishmanicida (BOECK *et al.*, 2006), antiproliferativa (BOUMENDJEL *et al.*, 2009), entre outras. Algumas chalconas induzem apoptose com envolvimento mitocondrial via estresse oxidativo em células de leucemia (L1210), diminuindo o potencial de membrana mitocondrial e ativando caspase-3 (WINTER *et al.*, 2010). As chalconas também promovem apoptose em outros modelos celulares, como em células de melanoma murino (B16-F10) (FORMENTO NAVARINI *et al.*, 2009) e células de câncer de próstata (DEEB *et al.*, 2010). Algumas chalconas também apresentam atividade inibidora de P-gp (LIU *et al.*, 2008) e ABCG2 (HAN *et al.*, 2008). Recentemente, Juvale e colaboradores (2011) realizaram um estudo de relação estrutura-atividade com chalconas, mostrando a importância de algumas substituições tanto no anel A, quanto anel B, para inibição de ABCG2.



FIGURA 14 – ESTRUTURA GERAL DAS CHALCONAS  
FONTE: O Autor (2012).

## 2.7. CROMONAS E ESTILBENOS

Na figura 15 são mostradas as estruturas gerais das classes das cromonas e dos estilbenos.

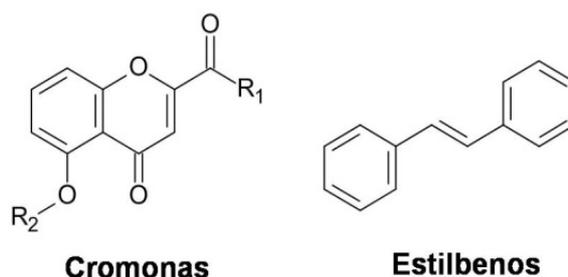


FIGURA 15 – ESTRUTURA GERAL DAS CROMONAS E ESTILBENOS  
FONTE: O Autor (2012).

### 2.7.1. Cromonas

As cromonas são derivados benzopirano substituídos com um grupo cetona no anel pirano (figura 15). Os benzopiranos são compostos orgânicos policíclicos que resultam da fusão de um anel benzeno com um anel pirano que são encontrados em compostos como os flavonóides. As cromonas utilizadas neste trabalho são estruturas originais, que foram idealizadas a partir de resultados anteriores verificados com outra classe de compostos, as acridonas. Entre as acridonas encontramos o GF120918 (elacridar) (figura 9) que foi primeiramente identificado como inibidor de P-gp e posteriormente de ABCG2 (BOUMENDJEL *et al.*, 2011). A partir do anel base destes compostos foram sintetizadas acridonas (ex.: MBLI-87) que se mostraram capazes de inibir o transporte de substratos realizado apenas por ABCG2. Estas acridonas tiveram sua atividade foi validada tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* (ARNAUD *et al.*, 2011).

### 2.7.2. Estilbenos

Os estilbenos (figura 15) também são polifenóis, sendo que os estilbenóides (estilbenos hidroxilados) podem ser encontrados em plantas. Como principal representante da classe dos estilbenóides destaca-se o resveratrol (*trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno), que é encontrado de maneira abundante na uva, vinho tinto, amendoins e outras frutas e bebidas consumidas diariamente (HSIEH e WU, 2010). O resveratrol possui várias atividades biológicas, incluindo: antioxidante, antienvhecimento, cardioprotetora, e principalmente antitumoral (HSIEH e WU, 2010; PERVAIZ e HOLME, 2009). Foi demonstrado que o resveratrol é capaz de reverter à resistência ao tratamento com doxorubicina em células de leucemia mielóide aguda, por diminuir a expressão de MRP1 (KWEON *et al.*, 2010). O resveratrol também promove indução de apoptose em diferentes modelos celulares como células de melanoma (KIM, 2012), glioblastoma (LIN *et al.*, 2011), pulmão (ZHANG *et al.*, 2011) entre outros (ATHAR *et al.*, 2009). Alguns estudos realizados em modelo animal mostraram que a ingestão de resveratrol inibe a progressão de câncer de próstata (HARPER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2008).

### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial efeito antitumoral de diferentes polifenóis utilizando duas diferentes estratégias. A primeira buscou esclarecer o mecanismo de morte em células de hepatoma humano, e a segunda buscou avaliar o papel desses compostos na reversão da resistência ao tratamento por quimioterápicos devido à superexpressão do transportador ABCG2.

Considerando que o CHC é um dos tumores de maior prevalência no mundo e que, até o momento, não existe uma droga eficiente para seu tratamento e que flavonóides já foram descritos por apresentarem efeito antiproliferativo seletivo em algumas células tumorais, tornou-se relevante avaliar mais detalhadamente os efeitos destes compostos também em células de hepatoma humano. Para atingir o objetivo geral com ênfase na primeira estratégia, foram utilizados os flavonóides: flavona, apigenina e morina, e avaliou-se a capacidade destes compostos em induzir morte em células de hepatoma humano (HepG2), modular os níveis de EROs e alterar a expressão e atividade das defesas antioxidantes. Para atingir esta meta os objetivos específicos foram:

- Avaliar os efeitos dos flavonóides sobre a viabilidade de células HepG2
- Avaliar parâmetros relacionados ao mecanismo de morte celular
- Avaliar modulação nos níveis de EROs
- Avaliar modulação na atividade e expressão das enzimas antioxidantes

Além disso, considerando que flavonóides, especialmente as flavonas, possuem capacidade de inibir ABCG2 (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005b), também foi objetivo deste trabalho estudar o efeito de uma flavona (hispidulina) e outros polifenóis (chalconas, cromonas e estilbenos) como inibidores do transporte de substratos por ABCG2.

Esta segunda estratégia foi avaliada através dos objetivos específicos a seguir:

- Avaliar a capacidade da hispidulina, chalconas, cromonas e estilbenos como inibidores de ABCG2
- Avaliar a seletividade destes compostos para ABCG2
- Avaliar a reversão da resistência em longos períodos de exposição
- Comparar o efeito citotóxico *versus* efeito inibidor
- Entender o mecanismo de inibição (tipo de inibição)

- Diferenciar os sítios de inibição para diferentes classes de inibidores de ABCG2

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS E REAGENTES

Meio DMEM alta glucose e soro fetal bovino (FBS) (Invitrogen) foram adquiridos da Cultilab (Campinas). Flavona, apigenina, morina, cristal violeta, NADPH, citocromo c, mitoxantrona, calceína, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) e DCFDA foram adquiridos da Sigma-Aldrich. DMSO foi obtido da Merck. Todos os outros reagentes utilizados apresentavam um alto grau de pureza.

#### 4.1.1. Compostos utilizados como inibidores de ABCG2

Os compostos testados como inibidores de ABCG2 foram obtidos de diferentes fontes: (i) a hispidulina foi obtida da Tocris Bioscience<sup>®</sup>, (ii) as chalconas e cromonas foram sintetizadas pelo Dr. AHCÈNE Boumendjel da Université de Grenoble, Département de Pharmacochimie Moléculaire, França, (iii) os estilbenos foram sintetizados pelo Dr. Corrado Tringali da University of Catania, Department of Chemical Sciences, Itália.

### 4.2. SOLUÇÕES

Os compostos foram dissolvidos em DMSO para obter uma solução estoque de 20 ou 100 mM e posteriormente diluídos em meio de cultura nas concentrações desejadas para cada experimento (0,1 – 100  $\mu$ M). As soluções em DMSO foram estocadas à -20°C e descongeladas no momento do uso.

### 4.3. CÉLULAS

A linhagem de hepatoma humano (HepG2) proveniente do *American Type Culture Collection* (ATCC), foi gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mari C. Sogayar do Instituto de Química (USP). As células foram mantidas utilizando meio DMEM alta glucose suplementado com 10% FBS e 50  $\mu$ g/mL de gentamicina em estufa sob atmosfera controlada com 5% CO<sub>2</sub> à 37°C.

A linhagem de células de rim embrionário humano HEK293 transfectadas com o gene que codifica para ABCG2 (HEK293-ABCG2), ou transfectadas com o vetor

vazio (HEK293-pcDNA3.1), foram obtidas como descrito previamente (ARNAUD *et al.*, 2011). O mutante de ABCG2 (HEK293-R482T), bem como as células HEK293 transfectadas com o gene que codifica para P-gp (HEK293-ABCB1) e transfectadas com o gene que codifica para MRP1 (HEK293-ABCC1) foram cedidas pela Dr<sup>a</sup> Susan E. Bates (NCI, NIH, Bethesda, MD). As células foram mantidas utilizando meio DMEM alta glucose suplementado com 10% de FBS e 1% penicilina/estreptomicina. As células HEK293-ABCG2, HEK293-R482T e HEK293-pcDNA3.1 foram suplementadas com o antibiótico de seleção G418 (0,75 mg/mL). As células HEK293-ABCB1 foram suplementadas com 2 mg/mL de G418 e as células HEK293-ABCC1 foram suplementadas com 5 µM de etoposídeo.

#### 4.4. VIABILIDADE CELULAR

##### 4.4.1. CRISTAL VIOLETA

Um dos métodos utilizados para avaliar a viabilidade celular foi o cristal violeta (KUENG *et al.*, 1989). Células HepG2 ( $2,5 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos flavonóides (flavona, apigenina e morina) (10, 25, 50 e 100 µM) por 24, 48, 96 e 144 horas. Para os ensaios de viabilidade celular realizados na presença de catalase, as células HepG2 ( $1 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com 100 µM de apigenina, concomitantemente com catalase exógena (100, 250, 500 e 1000 U/mL), BHA, BHT nas doses de 10, 50 e 100 µM e ácido ascórbico (100, 250 e 500 µM) por 24 horas.

##### 4.4.2. MTT

O outro método de viabilidade celular utilizado neste trabalho foi o MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (HEO *et al.*, 1990). As células HEK293ABCG2 ou HEK293-pcDNA3.1 ( $1 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos diferentes compostos (inibidores) (1 -100 µM), por 72 horas. Para os ensaios de reversão da resistência em células que superexpressam ABCG2, o ensaio de viabilidade celular foi realizado na presença de mitoxantrona ou SN-38, em co-tratamento com um inibidor, composto que está sendo testado (0,2 ou 1 µM), sob as mesmas condições citadas acima. Os controles (100% de células viáveis) foram

realizados com meio de cultura contendo 0,1% de DMSO (v/v). Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (sem tratamento).

#### 4.5. LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C NO CITOSOL

Células HepG2 ( $1 \times 10^6$ ) foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com 100  $\mu$ M (flavona ou apigenina) por 24 horas. A seguir a cultura de células foi lavada com PBS e ressuspensa em uma solução contendo Tris-HCl pH 7,2 (10 mg/mL), EGTA (3 mg/mL) e sacarose (50  $\mu$ g/mL). Essa suspensão de células foi incubada na presença de 10  $\mu$ M de digitonina por 30 minutos a 4°C. Após esta etapa as células foram centrifugadas a 10.000 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,22  $\mu$ m. A liberação de citocromo c foi avaliada acompanhando a absorvância da amostra em 414 nm usando um espectrofotômetro (Shimadzu UV-2450). Uma curva padrão foi realizada com citocromo c comercial (0,5 – 10  $\mu$ M). Os valores foram calculados baseados no  $\epsilon=100 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  de citocromo c em 414 nm (APPAIX *et al.*, 2000).

#### 4.6. ANÁLISE DE CICLO CELULAR

As células HepG2 ( $1 \times 10^6$ ) foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com 100  $\mu$ M de apigenina por 24 horas ou 100  $\mu$ M de flavona por 24 e 48 horas. Após o tratamento, o sobrenadante e as células aderidas foram coletadas centrifugadas a 2.000 x g por 5 minutos. No caso da apigenina as células foram fixadas. O *pellet* foi ressuspensa em 0,5 mL de PBS e posteriormente adicionado 4,5 mL de etanol 70%. As amostras foram mantidas a 4°C até análise por citometria de fluxo. Para marcação, a suspensão de células foi centrifugada novamente e o *pellet* solubilizado em 0,3 mL de uma solução de iodeto de propídeo 50  $\mu$ g/mL. As amostras foram analisadas em um citômetro FC500 (Beckman Counter) e os resultados calculados pelo programa MXP. No caso da flavona as amostras foram analisadas logo após a coleta. As amostras foram analisadas em um citômetro FACS Calibur (BD), 10-20 minutos após a marcação em 4°C (KRISHAN, 1975). Os cálculos foram realizados utilizando o programa Cyflogic e os resultados apresentados em histogramas.

#### 4.7. DUPLA MARCAÇÃO COM ANEXINA V/IODETO DE PROPÍDIO

Células HepG2 ( $1 \times 10^6$ ) foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com 100  $\mu$ M de flavona por 24 e 48 horas. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, coletadas e centrifugadas a 2.000 x g por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspense em 0,2 mL do tampão de ligação (NaCl 150 mM, KCl 5 mM,  $MgCl_2$  1 mM e  $CaCl_2$  1,8 mM em HEPES 10 mM pH 7.4). Após esta etapa, a suspensão de células foi centrifugada a 2.000 x g por 2 minutos e o *pellet* foi ressuspense em 0,1 mL do tampão de ligação contendo anexina V-FITC (1:1000). Após 20 minutos de incubação ao abrigo de luz, foram adicionados 0,3 mL de iodeto de propídio (10  $\mu$ g/mL em PBS) e em seguida analisado por citometria em FACS Calibur (BD). Os resultados foram apresentados em forma de dot-plot dividido em quatro quadrantes.

#### 4.8. ANÁLISE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Células HepG2 ( $1 \times 10^6$ ) foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com 100  $\mu$ M de flavona por 24 e 48 horas. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, coletadas e centrifugadas a 2000xg por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspense em 0.3 mL de PBS contendo 10  $\mu$ M de Rodamina123 (Rh123) e incubado por 20 minutos a 37°C ao abrigo de luz. Após esta etapa, a suspensão de células foi centrifugada e ressuspensa em 0.3 mL de PBS e analisada por citometria de fluxo. A média geométrica (Gmean) obtida dos histogramas foi utilizada para comparar as amostras. O programa utilizado para análise foi o WinMDI 2.9 e os resultados apresentados na forma de histogramas.

#### 4.9. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ERO EM MICROPLACA USANDO DCFDA

Para realizar um ensaio de cinética em curtos períodos de tempo, as células HepG2 ( $1 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 horas de adesão, as células foram lavadas duas vezes com PBS. Após esta etapa de lavagem, as células foram incubadas com 50  $\mu$ M de DCFDA (2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) diluída em PBS por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e tratadas com 100  $\mu$ M de apigenina ou 100  $\mu$ M de  $H_2O_2$  (controle positivo). Leituras durante o intervalo de 4 horas foram realizadas em leitor de fluorescência em microplaca (infinite 200 Tecan) com excitação em 485 nm e emissão em 525 nm. As

unidades arbitrárias de fluorescência foram normalizadas como 100% na condição controle (sem tratamento).

#### 4.10. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EROs POR CITOMETRIA DE FLUXO USANDO DCFDA

Para avaliar os níveis de ERO pela sonda DCFDA após longos períodos de tratamento, as células HepG2 ( $1 \times 10^6$ ) foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com 100  $\mu$ M de flavona por 1, 3, 6, 24 e 48 horas. Após o tratamento as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e coletadas. Após uma etapa de centrifugação o *pellet* foi incubado em 0,3 mL de PBS contendo 5  $\mu$ M de DCFDA (2'-7'-Dichlorodihidrofluoresceína diacetato) por 20 minutos a 37°C. Após, a suspensão de células foi centrifugada a 2000xg por 2 minutos e o *pellet* ressuspenso em 0,3 mL de PBS e analisado por citometria de fluxo (ERUSLANOV e KUSMARTSEV, 2010). A média geométrica (Gmean) obtida dos histogramas foi utilizada para comparar as amostras. O programa utilizado para análise foi o WinMDI 2.9.

#### 4.11. MICROSCOPIA OPTICA POR COLORAÇÃO COM HETOXILINA-EOSINA

Células HepG2 ( $2,5 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com 100  $\mu$ M de apigenina por 24 e 48 horas. Após o tratamento as lamínulas foram removidas e as células imediatamente fixadas com etanol absoluto e marcadas com hematoxilina-eosina. As células foram analisadas em um microscópio BEL Photonics.

#### 4.12. ENSAIO COMETA

Células HepG2 ( $0,5 \times 10^6$ ) foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com 100  $\mu$ M de flavona por 1, 3, 6, 24 e 48 horas. O ensaio foi realizado utilizando 10  $\mu$ L da suspensão de células após o tratamento e homogeneizado com 100  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Sigma), dissolvida em PBS. A suspensão de células em agarose foi espalhada em lâminas de microscópio previamente preparadas com agarose (1,5%) de ponto de fusão normal. As células foram cobertas com uma lamínula e deixadas a 4°C por 5 minutos. Após esta etapa, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas

em solução de lise contendo 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM Tris pH 10 por 24 horas a 4°C. Após a lise, as lâminas foram submetidas a uma eletroforese em tampão 300 mM NaOH e 1mM EDTA em pH 13, por 20 minutos (25 V e 300 mA). Após corrida, as lâminas foram lavadas em tampão de neutralização (0,4 M Tris-HCl pH 7.5) por 15 minutos. As lâminas foram secas a temperatura ambiente, imersas em etanol por 3 minutos e novamente secas a temperatura ambiente. Cada lâmina foi marcada com 50 µL de brometo de etídio (20 µg/mL) e analisada imediatamente em microscópio de fluorescência ZEISS modelo Axiovert 40 CFL. Todas as etapas foram realizadas ao abrigo de luz.

#### 4.13. WESTERN BLOT

Células HepG2 ( $0,5 \times 10^6$ ) foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com 100 µM de flavona por 6, 12, 24 e 48 horas. Após tratamento as células foram tripsinizadas, coletadas e centrifugadas a 2000xg por 5 min. O *pellet* foi lavado com PBS e novamente submetido à centrifugação. As células foram expostas a um tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% desoxicolate de sódio (DOC), 1% Triton X 100 e 0,1% SDS) por 1 hora a 4°C. O lisado de células foi centrifugado a 10000xg por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios. 150 µg de proteína foram utilizadas em gel SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada em TBST contendo 5% de leite em pó desnatado por 1 hora em temperatura ambiente. Após esta etapa, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo primário para detecção de p21 (Santa Cruz) seguido de incubação com anticorpo secundário anti-mouse conjugado a peroxidase e finalmente revelado usando filme raio X.

Células HEK293ABC2 ( $5 \times 10^5$ ) foram plaqueadas em placas de 35 mm. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com os compostos (cromonas 0,2, 1 e 10 µM) por 72 horas. Controle com células HEK293-pcDNA3.1 foi realizado. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS. As células foram coletadas em um tubo eppendorf e incubadas com 100 µL de tampão de lise (Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, triton X 1% e um *coktail* anti-protease), por 30 minutos em gelo. O lisado de células foi centrifugado a 13.000xg por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado ou estocado a -20°C. A concentração de proteína foi determinada por BCA e 20 µg de cada amostra foi resolvida em um gel SDS-PAGE 10% e transferido para membrana de nitrocelulose (BioRad). A membrana foi incubada com uma solução de bloqueio (5% de leite em pó e 0,05% Tween 20 em TBS) por 1

hora a temperatura ambiente. Após esta etapa a membrana foi incubada com anticorpo primário monoclonal contra ABCG2 (clone BXP-21 – Millipore), ou anticorpo primário monoclonal contra  $\alpha$ -Tubulina (Sigma), por 1 hora, seguido de incubação com anticorpo secundário anti-mouse conjugado com *horseradish* peroxidase (Sigma) e detectado usando um sistema de bioimagem BioRad. A densitometria das bandas foi realizada pelo programa Quantity One 1-D da BioRad. Os resultados foram expressos em relação ao controle.

#### 4.14. ISOLAMENTO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

Células HepG2 ( $1 \times 10^6$ ) foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com 100  $\mu$ M de flavona e apigenina por 24 horas. O RNA total foi isolado usando um kit (*spin mini RNA isolation kit* – Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Para a transcrição reversa foi utilizada a enzima *superscript III* (Invitrogen) e oligo d(T). A síntese de cDNA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.15. QUANTIFICAÇÃO DO mRNA POR qRT-PCR EM TEMPO REAL

A reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real foi realizada usando *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) em um sistema de detecção *StepOnePlus™ Real-Time PCR* (Applied Biosystems). Os primers usados para os genes alvos *CuZnSOD*, *MnSOD*, *CAT*, *Gred*, *Gpx1* e controles *HPRT*, *Tubulin* e *GAPDH* foram desenhados pelo programa Primer Express e validados através de BLAST e BLAT. As sequências de nucleotídeos dos primers estão listadas na tabela 6. Os níveis de expressão do mRNAs foram normalizados usando o programa geNorm 3.4 (PFAFFL, 2001; VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

TABELA 6 – SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA qRT-PCR

Gene	Primers
hCuZnSOD	F: 5' - GTGCAGGGCATCATCAATTTC - 3' R: 5' - AATCCATGCAGGCCTTCAGT - 3'
hZnSOD	F: 5' - GGACACTTACAAATTGCTGCTTGT - 3' R: 5' - AGTAAGCGTGCTCCCACACAT - 3'
hCAT	F: 5' - GATAGCCTTCGACCCAAGCA - 3' R: 5' - ATGGCGGTGAGTGTGTCAGGAT - 3'
hGSR	F: 5' - GTGGCACTTGCGTGAATGTT - 3' R: 5' - GGAAAGCCATAATCAGCATGATC - 3'
hGpx1	F: 5' - TGCTGGCCTCCCCTTACAG - 3' R: 5' - GCACACATGGCGCAATTG - 3'
hGAPDH	F: 5'-ACCCA CTCTCCACCTTTGA-3' R: 5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'
hTubulina	F: 5'- TCAACACCTTCTTCAGTCAAACG-3' R: 5'- AGTGCCAGTGCGAACTTCATC-3'
hHPRT	F: 5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' R: 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'

#### 4.16. MEDIDA DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

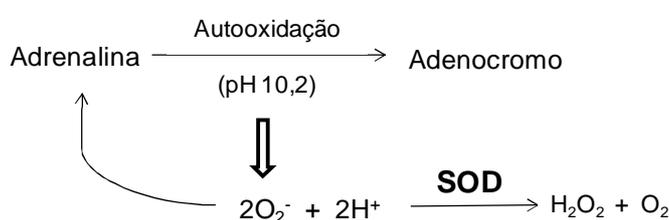
Células HepG2 ( $1 \times 10^6$ ) foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com 100  $\mu$ M de flavona ou apigenina por 24 horas. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, coletadas, ressuspensas em PBS e sonicadas em gelo por três vezes (20V/20s). Após, centrifugadas por 10 min a 13000xg a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios de atividade enzimática. Todos os ensaios para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes foram acompanhados em espectrofotômetro Shimadzu UV-2450, como descrito a seguir.

##### 4.16.1. ATIVIDADE DA CATALASE

A atividade da catalase foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância do  $H_2O_2$  a 240 nm (AEBI, 1984). O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0),  $H_2O_2$  10 mM e o extrato celular de HepG2 130  $\mu$ g de proteína.mL<sup>-1</sup>. O ensaio foi iniciado pela adição de  $H_2O_2$  e acompanhado durante 2 minutos. Os resultados expressos como porcentagem em relação ao controle foram calculados considerando o coeficiente de extinção molar do  $H_2O_2$  (43,6 mol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-1</sup>).

#### 4.16.2. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi avaliada espectrofotometricamente através da auto-oxidação da epinefrina monitorada em 480 nm (MCCORD e FRIDOVIC.I, 1969). O sistema de reação foi constituído de tampão carbonato 0,05 M (pH 10,2), adrenalina 1 mM e extrato celular de HepG2 150 µg de proteína.mL<sup>-1</sup> a 30 °C. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína capaz de inibir 50% da atividade. Os resultados foram expressos em relação ao controle, sendo o controle definido como 100% de atividade ou 1 unidade de SOD.



#### 4.16.3. GLUTATIONA REDUTASE (Gred)

A atividade da Gred foi avaliada espectrofotometricamente (SIES *et al.*, 1979). Neste ensaio a Gred catalisa a redução da glutationa na presença de NADPH. O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM, GSSG 0,66 mM, NADPH 0,075 mM e extrato celular de HepG2 50 µg de proteína.mL<sup>-1</sup>. A reação foi iniciada pela adição de GSSG e a absorbância acompanhada durante 5 minutos a 340 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH (6220 mol.L<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>).

#### 4.17. INIBIÇÃO DOS TRANSPORTADORES ABC (ABCG2, P-gp E MRP1)

As células HEK293 (1 x 10<sup>5</sup>) foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após 48 horas de adesão, as células foram tratadas com 5 µM de mitoxantrona ou outros substratos como descrito nas legendas das figuras, como calceína, Hoechst 33342, Feoforbideo a ou BODIPY Prazosina por 30 minutos a 37°C na presença ou ausência de diferentes concentrações dos compostos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, coletadas, ressuspensas em 0,2 mL de PBS e mantidas em gelo até análise por citometria de fluxo. Foram coletados 10.000 eventos de cada amostra,

sendo que o controle de 100% de inibição foi obtido pela fluorescência (GMean), das células controle (transfectadas com o vetor vazio), ou usando células HEK293ABCG2 incubadas com 5  $\mu$ M de GF120918 (inibidor de referência) (ROBEY *et al.*, 2001). Os valores de IC50 foram calculados utilizando os programas SigmaPlot ou GraphPadPrism.

#### 4.18. MEDIDA DA ATIVIDADE ATPase DE ABCG2

A medida da atividade ATPase de ABCG2 foi realizada quantificando o fosfato inorgânico liberado do ATP por um ensaio colorimétrico (POZZA *et al.*, 2006). As membranas foram obtidas de células HEK293ABCG2 como descrito por Pozza *et al.*, (2006). As membranas (10  $\mu$ g) foram incubadas por 30 minutos a 37°C em tampão (Tris 50 mM pH 7,5 e NaCl 50 mM), suplementado com 5 mM de ATP, 5 mM de  $\text{NaN}_3$ , 7 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM de EGTA, 2 mM ouabaína, inibidores de ABCG2 em diferentes concentrações na presença ou ausência de 0,6 mM de vanadato, em um volume final de 60  $\mu$ L. Após a incubação, a reação foi parada pela adição de 30  $\mu$ L de SDS por 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, 180  $\mu$ L foram adicionados da solução B (solução A: 2,16 g de molibdato de amônio dissolvido em 35 mL de acetato de zinco 15 mM; solução B: 5 mL da solução A dissolvida em 20 mL de ácido ascórbico 20  $\mu$ M pH 5). Após 20 minutos de incubação a 37°C, o fosfato liberado foi quantificado em 620 nm.

#### 4.19. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DOS COMPOSTOS POR HPLC-MS/MS

As células HEK293ABCG2 ou HEK293-pcDNA3.1 ( $5 \times 10^5$ ) foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após 48 horas de adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos diferentes compostos (inibidores) (na faixa de concentração como indicado nas figuras), por 30 minutos. As células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. Após esta etapa, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS e centrifugadas a 1.000xg por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de PBS e 50  $\mu$ L foi retirado para quantificação de proteína. A suspensão de células foi novamente centrifugada e ressuspensa em 50  $\mu$ L de metanol e então estocadas a -80°C até análise. A quantidade intracelular dos diferentes compostos foi verificada usando um *triple quadrupole tandem mass spectrometer* com eletrospray acoplado a um cromatógrafo da ThermoFisher (LC-ESI-MS/MS) A separação foi realizada utilizando uma coluna HypersilGold 3,0  $\mu$ m (100 mm x 2,1 mm i.d. - Waters) em um

modo gradiente de água e acetonitrila, ambos em 0,1% de ácido fórmico como fase móvel sob um fluxo de 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Os compostos foram ionizados por eletrospray em modo positivo e todos os compostos foram quantificados por *selected reaction monitoring* (SRM). Para cada molécula a energia de transição e colisão foi selecionada para obter a melhor sensibilidade. Estes ensaios foram realizados no *laboratoire de Biologie-Toxicologie (Centre Hospitalier Lyon-Sud)* pelo Dr. Jérôme Guillon (VALDAMERI *et al.*, 2012a; VALDAMERI *et al.*, 2012b).

#### 4.20. USO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 5D3

Células HEK293ABC2 ou HEK293-pcDNA3.1 ( $0,5 \times 10^6$ ) foram centrifugadas a 1.000xg por 3 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em 0,2 mL de PBS contendo BSA (0,02 mg/mL). A suspensão de células foi incubada com os compostos (inibidores e substratos) nas concentrações indicadas nas figuras por 10 minutos a 37°C e posteriormente incubada com 20  $\mu\text{L}$  do anticorpo 5D3 conjugado com *phycoerythrin* (eBioscience), ou 20  $\mu\text{L}$  do anticorpo controle IgG2b, também conjugado com *phycoerythrin* (eBioscience), por 30 minutos a 37°C. Após esta etapa, as células foram centrifugadas a 1.000xg por 3 minutos e o *pellet* ressuspenso em 0,3 mL de PBS sendo imediatamente analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em relação ao controle.

#### 4.21. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford com uso de uma curva de calibração com albumina (BRADFORD, 1976), ou por BCA.

#### 4.22. MODELO MOLECULAR

Os compostos foram analisados pelo programa de modelagem molecular Sybyl X 1.3 e minimizado por MMFF94 com uma constante dielétrica de 80 e um *cut off* eletrostático de 16 Å (HALGREN, 1999). Após minimizar a energia das moléculas, a estrutura base foi alinhada pelo programa e as cadeias laterais foram alinhadas manualmente. Um 3D-QSAR foi realizado pelo programa CoMFA utilizando os valores de inibição de ABC2 na concentração de 2  $\mu\text{M}$  no laboratório de *Bioinformatique: structures et interactions* do IBCP (Lyon, França) pelo Dr. Raphaël Terreaux (VALDAMERI *et al.*, 2012a).

#### 4.23. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de média  $\pm$  DP foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) e teste Bartlett seguido pelo teste Tukey ou Kruskal-Wallis/Dunn's utilizando o programa GraphPad Prism 5. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. EFEITO DOS FLAVONÓIDES SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2

Para verificar o efeito dos flavonóides sobre a viabilidade das células HepG2 e realizar um *screening* para nortear quais as concentrações e tempos de exposição seriam utilizados nos experimentos subseqüentes, foi realizado um ensaio de viabilidade celular utilizando o método do cristal violeta. Células HepG2 foram tratadas com os flavonóides selecionados para o presente estudo (flavona, apigenina e morina) em diferentes concentrações (10-100  $\mu\text{M}$ ) e tempos de exposição (24-144 horas). Os resultados obtidos estão indicados na tabela 7 e figura 16. Foi observado que dentre os três flavonóides testados, apenas a morina não apresentou efeito citotóxico significativo nas concentrações testadas. Com base neste resultado, definiu-se para os experimentos seguintes somente a continuidade do estudo com a flavona e apigenina.

TABELA 7 - EFEITO DOS FLAVONÓIDES SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2

Flavonóides	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	% de células viáveis			
		24 horas	48 horas	96 horas	144 horas
Controle	-	100 $\pm$ 6,8	100 $\pm$ 6,8	100 $\pm$ 6,8	100 $\pm$ 6,8
DMSO	0,1%	102,5 $\pm$ 10,3	102,4 $\pm$ 11,1	100,6 $\pm$ 3,4	100,2 $\pm$ 8,9
Flavona	10	98,3 $\pm$ 6,7	100,6 $\pm$ 9,0	97,9 $\pm$ 9,1	108,2 $\pm$ 14,3
	25	96,2 $\pm$ 8,0	89,2 $\pm$ 12,3	94,3 $\pm$ 7,4	110,1 $\pm$ 11,4
	50	85,1 $\pm$ 15,0*	76,6 $\pm$ 7,7*	53,2 $\pm$ 8,9*	51,7 $\pm$ 8,1*
	100	86,5 $\pm$ 7,9*	66,6 $\pm$ 7,0*	37,8 $\pm$ 6,2*	29,2 $\pm$ 4,5*
Apigenina	10	83,3 $\pm$ 9,1*	74,3 $\pm$ 7,5*	54,1 $\pm$ 16,6*	38,2 $\pm$ 5,3*
	25	75,4 $\pm$ 5,9*	49,7 $\pm$ 15,5*	20,6 $\pm$ 3,9*	10,7 $\pm$ 4,2*
	50	67,0 $\pm$ 9,7*	35,9 $\pm$ 6,3*	16,0 $\pm$ 4,7*	10,1 $\pm$ 3,7*
	100	60,5 $\pm$ 9,0*	34,1 $\pm$ 8,5*	13,9 $\pm$ 5,9*	9,8 $\pm$ 3,5*
Morina	10	92,4 $\pm$ 15,3	93,6 $\pm$ 6,4	105,1 $\pm$ 5,4	106,6 $\pm$ 12,3
	25	106,7 $\pm$ 15,7	101,6 $\pm$ 10,7	106,8 $\pm$ 4,2	94,8 $\pm$ 5,3
	50	97,3 $\pm$ 13,3	103,6 $\pm$ 4,4	100,5 $\pm$ 19,6	105,6 $\pm$ 4,1
	100	98,2 $\pm$ 13,4	94,4 $\pm$ 10,5	106,4 $\pm$ 7,7	110,7 $\pm$ 18,1

FONTE: O autor (2012)

NOTA: A viabilidade celular foi avaliada pelo método do cristal violeta na ausência e presença de diferentes concentrações de flavonóides após 24, 48, 96 e 144 horas de tratamento em células HepG2. Os valores da porcentagem de células viáveis foram expressos em relação ao controle (sem tratamento). Os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes em triplicata. \*Significativamente diferente do controle com  $p < 0,05$ .

Os resultados dos efeitos da flavona e apigenina sobre a viabilidade celular em células HepG2 apresentados na tabela 7, também estão representados na figura 16.

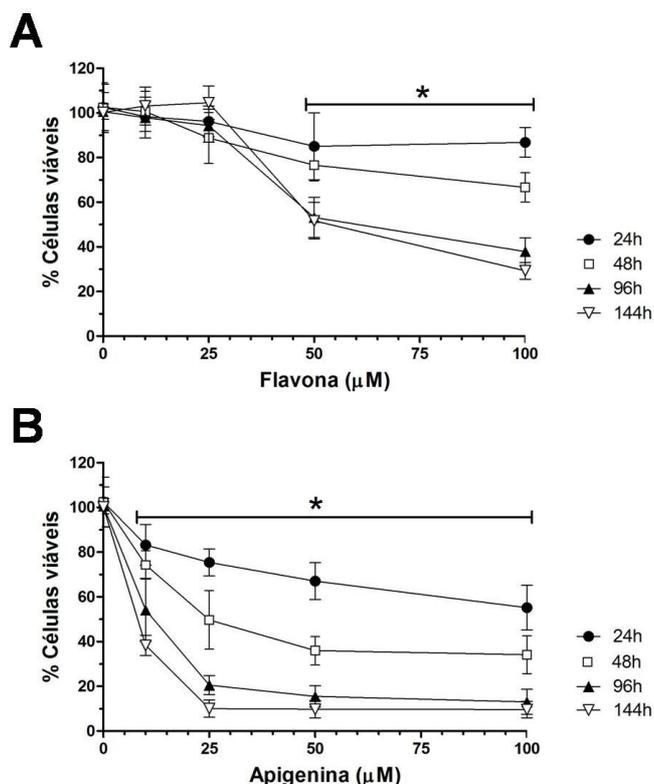


FIGURA 16 – EFEITOS DA FLAVONA E APIGENINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS HepG2

FONTE: O Autor (2012)

Nota: Análise de viabilidade de células HepG2 realizado segundo o item 4.4.1 de materiais e métodos após serem expostas à apigenina ou flavona em diferentes concentrações (10 – 100 µM) e diferentes tempos (24, 48, 96 e 144 horas). Os valores da porcentagem de células viáveis foram expressos em relação ao controle (sem tratamento). Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes em triplicata. (A) Flavona (B) Apigenina. \*Significativamente diferente do controle com  $p < 0,05$ .

Pode-se observar na figura 16A e tabela 7, que o tratamento das células HepG2 com a flavona nas concentrações de 10 e 25 µM não alterou a viabilidade celular de maneira significativa nos tempos testados. Entretanto, a exposição das células HepG2 com a flavona (50 µM) promoveu uma redução significativa da viabilidade de 15, 24, 47 e 49% para os tempos de 24, 48, 96 e 144 horas, respectivamente (figura 16A). Pode-se observar que na concentração de 100 µM, o tratamento com flavona por 24, 48, 96 e 144 horas promoveu a morte em células HepG2 atingindo as porcentagens de 13, 33, 62 e 71%, respectivamente (figura 16A).

Esses resultados estão de acordo com dados obtidos da literatura mostrando que a flavona (50 – 150 µM) induz morte em células de adenocarcinoma de pulmão (A549) (BAI *et al.*, 1998), câncer de cólon (HT-29) (WENZEL *et al.*, 2000; WENZEL *et*

*al.*, 2005) e diferentes linhagens de câncer de mama (ULLMANNOVA e POPESCU, 2007).

Diferentemente da flavona, a apigenina apresentou efeito citotóxico sobre células HepG2 já em 24 horas de tratamento e na menor concentração de apigenina testada (10  $\mu\text{M}$ ), onde foi observado uma diminuição significativa na viabilidade celular de 16% (figura 16B). Foi observado que a exposição das células HepG2 à apigenina (100  $\mu\text{M}$ ) promoveu uma redução significativa da viabilidade de 40, 66, 87 e 91% para os tempos de 24, 48, 96 e 144 horas, respectivamente (figura 16B).

Os dados do presente trabalho estão de acordo com vários autores que mostram que a apigenina induz morte em diferentes linhagens de células tumorais humanas, como por exemplo: carcinoma de cólon (Hela) (ZHENG *et al.*, 2005), leucemia aguda (HL-60) (WANG *et al.*, 1999), células de câncer de mama (WAY *et al.*, 2004), células epiteliais de câncer de próstata (MORRISSEY *et al.*, 2005) e câncer de pulmão (A549) (LU *et al.*, 2010). Os resultados obtidos neste trabalho também estão de acordo com Chiang *et al.*, (2006), que avaliou os efeitos da apigenina em células de carcinoma hepatocelular (HepG2) pelo método do MTT, encontrando um valor de  $\text{IC}_{50}$  de 8  $\mu\text{g/mL}$  (29,6  $\mu\text{M}$ ), após 48 horas de tratamento, valor muito próximo (~25  $\mu\text{M}$ ) do encontrado neste trabalho utilizando outro método (cristal violeta). Contudo, Choi e colaboradores (2007) também avaliaram a viabilidade celular pelo método MTT em células HepG2, encontrando um valor de  $\text{IC}_{50}$  de ~7  $\mu\text{M}$  após 48 horas de tratamento, mostrando um efeito citotóxico mais pronunciado em comparação com os dados obtidos neste trabalho, porém, confirmando os efeitos citotóxicos deste flavonóide.

Os resultados de viabilidade celular mostraram que tanto a flavona quanto a apigenina induzem a morte de células HepG2 e que nas mesmas condições experimentais a apigenina é mais citotóxica que a flavona, provavelmente devido aos grupamentos hidroxí presentes em sua estrutura. Foi observado que em ambos os tratamentos não ocorreu diferença de viabilidade celular nos tempos de 96 e 144 horas, sugerindo que o efeito citotóxico induzido por estes flavonóides em células HepG2 foi máximo já em 96 horas de exposição (figura 16B).

Nos trabalhos acima citados que mostram os efeitos citotóxicos das flavonas em células tumorais, foi observado que o mecanismo de morte celular envolvido é o apoptótico, então, a próxima etapa do nosso trabalho foi avaliar o mecanismo de morte celular induzido pela flavona e apigenina em células de hepatoma humano (HepG2), bem como avaliar o possível envolvimento de EROs nesse processo.

## 5.2. EFEITOS DA FLAVONA E APIGENINA NA LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C NO CITOSOL EM CÉLULAS HepG2

Para melhor entender o mecanismo de morte celular e avaliar o envolvimento mitocondrial na morte celular induzida pelas flavonas, a liberação de citocromo *c* no citosol foi avaliada após tratamento das células HepG2 com flavona e apigenina (100  $\mu$ M) por 24 horas, condição onde ambas as flavonas promovem efeitos citotóxicos significativos em células HepG2. Foi observado que a flavona não apresentou efeito significativo na liberação de citocromo *c* no citosol, ao contrário do observado com o tratamento com a apigenina, que induziu um aumento significativo (maior que 2 vezes) na liberação de citocromo *c* no citosol em relação ao controle (figura 17).

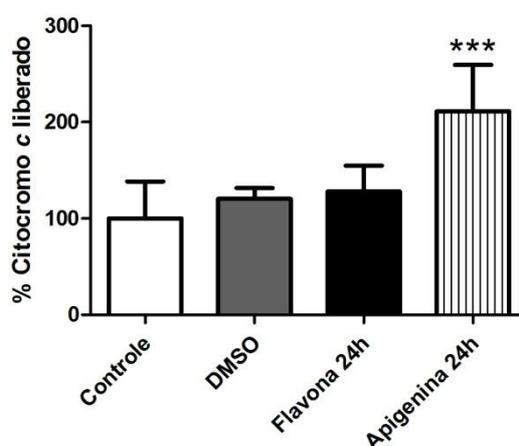


FIGURA 17 – EFEITOS DA FLAVONA E APIGENINA NA LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C NO CITOSOL

FONTE: O Autor (2012)

Nota: Análise de liberação de citocromo *c* foi realizado segundo o item 4.5 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com flavona e apigenina (100  $\mu$ M) por 24 horas. Os valores da porcentagem de liberação de citocromo *c* foram expressos em relação ao controle (sem tratamento). Os dados representam a média  $\pm$  DP de cinco experimentos independentes em triplicata. O controle (100%) corresponde a  $1,12 \pm 0,24$  nmol de citocromo *c* liberado por minuto por mg de proteína. \*\*\*Significativamente diferente do controle com  $p < 0,001$ .

Os resultados obtidos com a apigenina estão de acordo com Wang e colaboradores (1999). Estes autores observaram que o tratamento de células de leucemia (HL-60) com apigenina (60  $\mu$ M) por 12 horas induzem a liberação de citocromo *c* no citosol e a ativação de caspase-9. Os resultados obtidos neste trabalho também estão de acordo com Khan e colaboradores (2006), que mostraram em células HepG2 que o tratamento por 12 horas com apigenina (50  $\mu$ M) aumenta a atividade das caspases-3,-7,-9 e -10 de maneira dose dependente, sugerindo que a apigenina induz apoptose em células HepG2 com envolvimento da via mitocondrial.

Norteados por esse efeito diferencial da flavona *versus* apigenina sobre o mecanismo de morte celular em células HepG2, diferentes ensaios foram realizados com estas flavonas na tentativa de melhor entender o mecanismo de ação das mesmas.

### 5.3. EFEITOS DA FLAVONA EM CÉLULAS HepG2

#### 5.3.1. EFEITOS DA FLAVONA SOBRE A GERAÇÃO DE DANOS AO DNA E EXPRESSÃO DE p21 EM CÉLULAS HepG2

Foi realizado o ensaio cometa em condições alcalinas para avaliar possíveis danos ao DNA causados pelo tratamento das células HepG2 com flavona (100  $\mu$ M) por 1, 3, 6, 24 e 48 horas. Como mostrado na figura 18A, a exposição de células HepG2 à flavona (100  $\mu$ M) induziu danos ao DNA já nas primeiras horas de exposição, com um efeito mais pronunciado em 3 horas de tratamento, entretanto, em longos períodos de exposição (24 e 48 horas), foi observado um efeito moderado sobre a quebra de DNA. Para avaliar o envolvimento de p21, uma proteína responsável pelo controle do ciclo celular e responsiva a agentes que causam danos ao DNA, foi monitorado o nível de expressão da proteína p21 em extratos proteicos derivados de células HepG2 após tratamento com flavona (100  $\mu$ M) por 6, 12, 24 e 48 horas. Foi observado que o tratamento das células HepG2 com flavona por um período de 6 horas promove um aumento nos níveis da proteína p21, provavelmente como uma tentativa de reparo dos danos ao DNA causados pela flavona. Entretanto, não foram observadas variações em longos períodos de exposição à flavona (24 e 48 horas) (figura 18B).

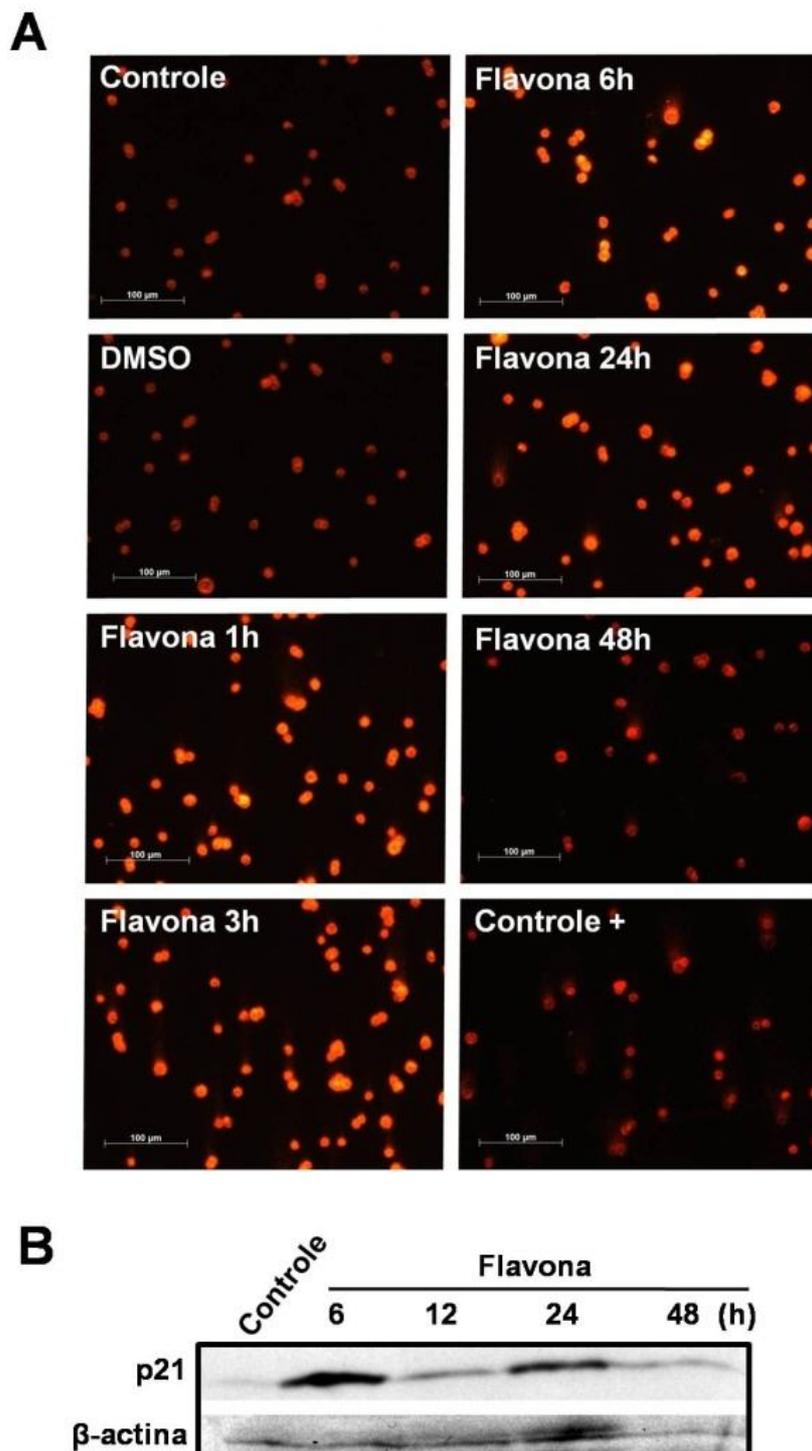


FIGURA 18 – EFEITOS DA FLAVONA SOBRE DANOS NO DNA E EXPRESSÃO DE p21  
 FONTE: O Autor (2012)

Nota: **(A)** Análise de danos ao DNA avaliada pelo ensaio cometa foi realizada segundo o item 4.12 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com flavona (100 µM) por 1, 3, 6, 24 e 48 horas. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) foi utilizado como controle positivo. A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em duplicata. **(B)** Análise da expressão dos níveis de proteína p21 foi realizada segundo o item 4.14 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com flavona (100 µM) por 6, 12, 24 e 48 horas. Os dados representam três experimentos independentes.

Estes resultados estão de acordo com Shin *et al.*, (2001), que observaram danos ao DNA e aumento dos níveis de p21 em células de câncer de cólon humano (HCT116) após tratamento por 12 horas com uma flavona metoxilada (5-MF). Também foi observado que o tratamento de células de adenocarcinoma de pulmão (A549) com flavona (100  $\mu$ M) por 3 horas aumenta os níveis de mRNA de p21 (monitorado por *northern blot*) e também os níveis da proteína p21 (monitorado por *western blot*) após 12 horas de tratamento (BAI *et al.*, 1998). Entretanto, neste mesmo trabalho foi verificado que o tratamento com flavona não alterou os níveis de p53, sugerindo que a indução de p21 por flavona em células A549 é independente de p53 (BAI *et al.*, 1998).

### 5.3.2. EFEITOS DA FLAVONA SOBRE A EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS HepG2

Na tentativa de elucidar o mecanismo de morte celular promovido pela flavona em células HepG2 foi realizado o ensaio de dupla marcação com anexina-V (que reconhece a fosfatidilserina) e iodeto de propídio (IP - que marca DNA). A população anexina-V<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup> foi considerada como controle, enquanto que a população de células anexina-V<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> foi considerada em apoptose inicial, devido à externalização da fosfatidilserina. Como mostrado na figura 19A, exposição das células HepG2 à flavona (100  $\mu$ M) por 24 e 48 horas promoveu um aumento na população anexina-V<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> de 12 e 16%, respectivamente. Em seguida, foi realizada uma análise da distribuição das células HepG2 pelas diferentes fases do ciclo celular após o tratamento com flavona, utilizando marcação do DNA com iodeto de propídio. Os resultados indicam que o tratamento das células HepG2 com flavona (100  $\mu$ M) por 24 e 48 horas aumentou significativamente a porcentagem de células em subG1 (DNA fragmentado) (figura 19B). Esses resultados sugerem que a morte celular esta sendo causada por apoptose e corrobora com dados descritos na literatura, nos quais é sugerido que em outras linhagens celulares a flavona é capaz de induzir apoptose (BAI *et al.*, 1998; ULLMANNOVA e POPESCU, 2007; WENZEL *et al.*, 2000).

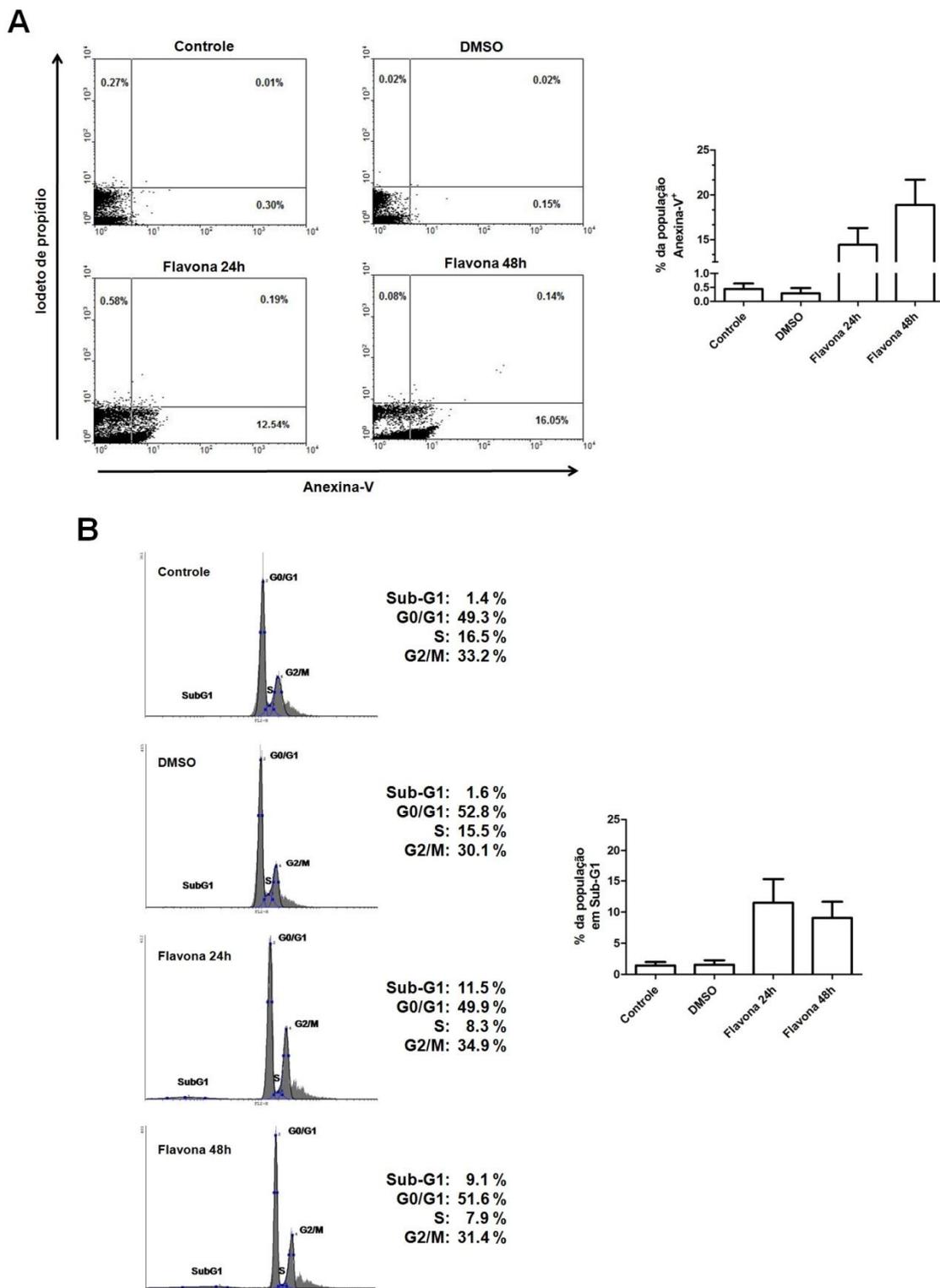


FIGURA 19 – EFEITOS DA FLAVONA SOBRE A EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E FRAGMENTAÇÃO DE DNA  
 FONTE: O Autor (2012)

Nota: (A) Análise de dupla marcação com anexina-V e iodeto de propídio por citometria de fluxo foi realizada segundo o item 4.7 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com flavona (100  $\mu$ M) por 24 e 48 horas. A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em duplicata. (B) Análise da marcação com iodeto de propídeo para análise de ciclo celular foi realizada segundo o item 4.6 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com flavona (100  $\mu$ M) por 24 e 48 horas. A figura é representativa de quatro experimentos independentes realizados em duplicata.

#### 5.4.3. EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ ) EM CÉLULAS HepG2

Além da liberação de citocromo c no citosol, outro marcador do envolvimento da via mitocondrial na morte celular é a redução do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ), que foi avaliado por citometria de fluxo usando Rodamina 123 (Rh123) em células HepG2 após exposição com flavona. Foi observado que o tratamento das células HepG2 com 100  $\mu$ M de flavona por 24 e 48 horas não afetou os valores de potencial de membrana. Entretanto, em células HepG2 expostas ao FCCP (*p*-trifluorometoxi-carbonil cianida fenil hidrazona), um agente desacoplador utilizado como controle positivo, pode-se observar claramente uma redução no potencial de membrana mitocondrial (Figura 20).

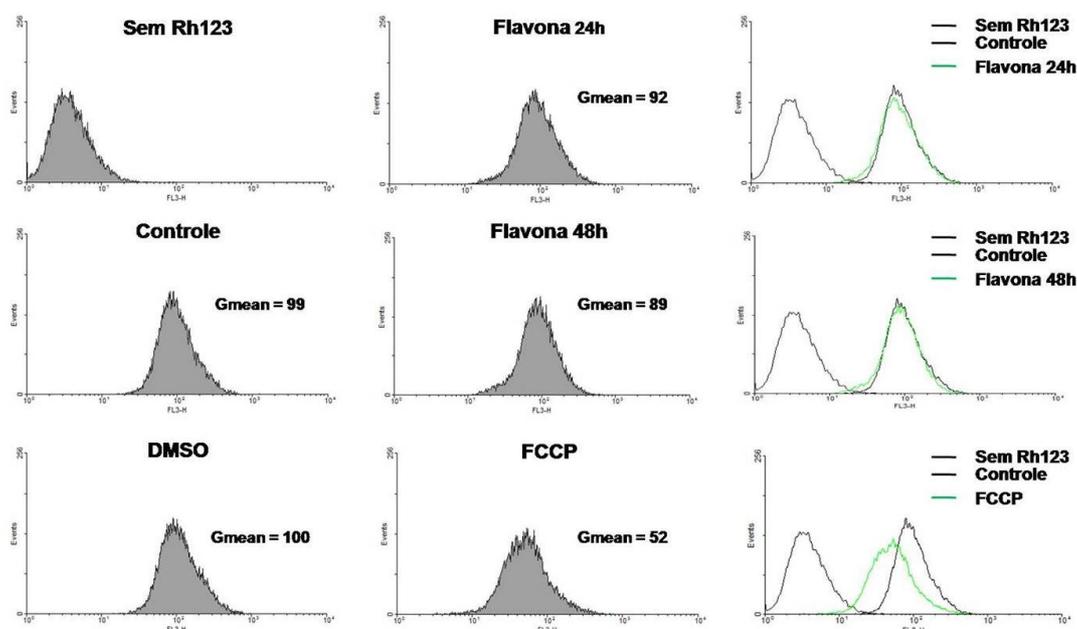


FIGURA 20 – EFEITOS DA FLAVONA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ )

FONTE: O Autor (2012)

Nota: Análise do  $\Delta\Psi$  por citometria de fluxo utilizando Rhodamina 123 (Rho123) como descrito no item 4.8 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com flavona (100  $\mu$ M) por 24 e 48 horas. Os histogramas representam a fluorescência da Rho123 em células HepG2. FCCP (*p*-trifluorometoxi-carbonil cianide phenyl hydrazone) foi utilizado como controle positivo. A figura é representativa de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Os resultados obtidos pelo ensaio de liberação de citocromo c (figura 17) e potencial de membrana mitocondrial (figura 20), sugerem o não envolvimento mitocondrial na morte celular induzida por flavona em células HepG2. Entretanto, utilizando como modelo mitocôndrias isoladas de fígado de rato, foi verificado

anteriormente em nosso laboratório que a flavona é capaz de promover alterações no metabolismo mitocondrial (VALDAMERI *et al.*, 2010). Foi observado que a flavona promove uma redução no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ) e na velocidade respiratória no estado 3, causado pela inibição da atividade das enzimas da cadeia respiratória localizadas entre os complexos I e III (VALDAMERI *et al.*, 2010). Esta diferença nos resultados podem ser explicadas por três diferentes fatores; (i) por se tratarem de análises utilizando modelos com níveis de complexidades distintos (organela isolada *versus* célula tumoral), (ii) tempo de exposição e (iii) disponibilidade do composto na organela.

Uma hipótese para o mecanismo pelo qual a flavona induz morte em células HepG2 é que este processo possa estar acontecendo pela via extrínseca, através da participação de receptores de morte. Entretanto, para uma conclusão final mais experimentos são necessários para apoiar essa hipótese. De acordo com Jacquemin *et al.*, (2010), tanto a via intrínseca quanto a extrínseca da apoptose podem ser moduladas por polifenóis, sendo que a ativação vai depender de uma série de fatores, tais como: (i) tipo celular, (ii) características do composto e (iii) as condições do tratamento.

#### 5.4.4. EFEITOS DA FLAVONA NOS NÍVEIS DE EROs EM CÉLULAS HepG2

Para avaliar o possível envolvimento de EROs no mecanismo de morte celular induzido por flavona, foi utilizada uma sonda fluorescente chamada DCF-DA (2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) e realizado ensaios de citometria de fluxo para detectar os níveis intracelulares de EROs. Como apresentado na figura 21, o tratamento das células HepG2 com 100  $\mu$ M de flavona por 24 horas diminuiu os níveis de EROs, entretanto, nos tempos de 1, 3, 6 e 48 horas não foi observada diferença evidente nos níveis de EROs intracelular quando comparados ao controle. O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizado como um controle positivo (figura 21). Estes resultados corroboram com Indran *et al.*, (2001), que sugere que a indução da apoptose pela via mitocondrial está mais susceptível ao aumento nos níveis de EROs quando comparado aos outros tipos de morte celular.

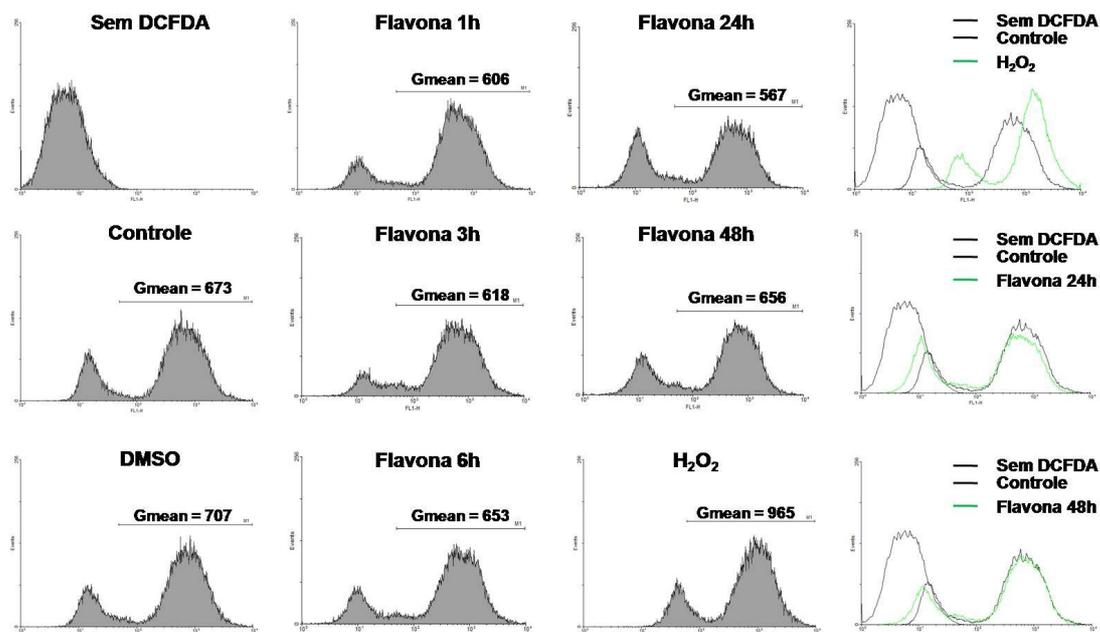


FIGURA 21 – EFEITOS DA FLAVONA NOS NÍVEIS DE ERO  
 FONTE: O Autor (2012)

Nota: Análise dos níveis intracelulares de ERO utilizando DCFDA por citometria de fluxo foi realizada segundo o item 4.10 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com flavona (100  $\mu$ M) por 1, 3, 6, 24 e 48 horas. Os histogramas representam a fluorescência da sonda fluorescebe DCF em células HepG2 e a figura é representativa de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. 400  $\mu$ M de  $H_2O_2$  por 30 minutos foi usado como controle positivo.

#### 5.4.5. EFEITOS DA FLAVONA NA EXPRESSÃO DO mRNA DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS HepG2

Para melhor entender o mecanismo de ação da flavona em células HepG2, foram avaliados os níveis de mRNA das enzimas antioxidantes: glutationa redutase (Gred), catalase (CAT), glutationa peroxidase (Gpx1) e superóxido dismutase (CuZnSOD e MnSOD) por qRT-PCR. A expressão relativa de mRNA foi normalizada por três genes de expressão constitutiva: HPRT, tubulina e GAPDH usando o programa geNorm 3.4. Foi observado que o tratamento das células HepG2 com flavona (100  $\mu$ M) por 24 horas aumentou em aproximadamente três vezes os níveis de expressão de Gred, CuZnSOD e MnSOD, entretanto, foi observado um efeito oposto nos níveis de expressão de Gpx1, uma redução de aproximadamente três vezes (figura 22). Também foi observado que o tratamento com flavona (100  $\mu$ M) por 24 horas não altera o nível de expressão de catalase (figura 22).

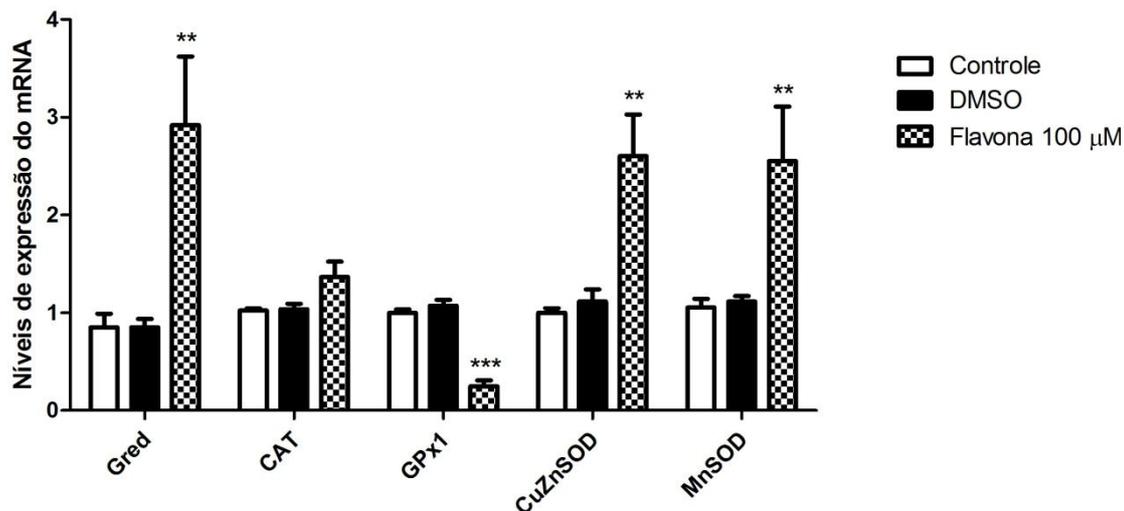


FIGURA 22 – EFEITOS DA FLAVONA NA EXPRESSÃO DO mRNA DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

FONTE: O Autor (2012)

Nota: Análise da quantidade relativa dos níveis de mRNA das enzimas glutathiona redutase (Gred), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx1), CuZn superóxido dismutase (CuZnSOD) e Mn superóxido dismutase (MnSOD) foi realizada segundo o item 4.15 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com flavona (100 µM) por 24 horas. Os dados foram normalizados usando três genes controles (HPRT, tubulina e GAPDH) através do programa geNorm 3.4. Os valores representam a média ± DP em relação ao controle de três experimentos independentes. \*\* para  $p < 0,005$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a diminuição nos níveis de EROs em células HepG2 após exposição com flavona (100 µM) por 24 horas (figura 21) podem ocorrer devido ao aumento na expressão das enzimas superóxido dismutases, tanto a forma mitocondrial (MnSOD), quanto a forma citosólica (CuZnSOD) (figura 22). O aumento nos níveis de expressão de Gred e diminuição de Gpx1 sugerem que o balanço entre Gred e Gpx1 pode estar sendo modulado na tentativa de manter os níveis de GSH elevados durante o processo de morte celular e que talvez a redução nos níveis de EROs (figura 21), pode ser uma consequência da modulação da expressão destas enzimas antioxidantes (figura 22) na tentativa de proteger as células tumorais da morte.

Estes efeitos promovidos pela flavona podem também estar relacionados com a habilidade que alguns flavonóides possuem em ativar a via Keap1-Nrf2. O Nrf2 é um fator de transcrição que se liga a região promotora chamada ARE (elemento de resposta antioxidante), iniciando a transcrição de genes envolvidos nas defesas antioxidantes, como a catalase, SOD, glutathiona S-transferase entre outras (ANTELMANN e HELMANN, 2011). O tratamento de células HepG2 com quercetina, um flavonol muito estudado, induz um aumento na expressão de Nrf2 protegendo sua degradação proteossomal (TANIGAWA *et al.*, 2007). Entretanto, o tratamento de células de câncer de pulmão (A549) com luteolina (uma flavona), diminuiu a expressão

de Nrf2 tanto ao nível transcricional quanto traducional, diminuindo a expressão de enzimas antioxidantes responsivas a ARE (TANG *et al.*, 2011). Como o tratamento de células HepG2 com flavona foi capaz de modular algumas enzimas antioxidantes, é possível sugerir que pode existir o envolvimento de Nrf2, fazendo desta via um interessante candidato para estudos posteriores.

## 5.5. EFEITOS DA APIGENINA EM CÉLULAS HepG2

### 5.5.1. EFEITOS DA APIGENINA SOBRE A FRAGMENTAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS HepG2

Como apresentado na tabela 7 e figura 16B, o tratamento das células HepG2 com apigenina na concentração de 100  $\mu\text{M}$  por 24 horas promoveu uma redução de 40,5% na viabilidade de células HepG2. Diferentemente da flavona, a apigenina induziu a liberação de citocromo *c* no citosol (figura 17), resultado que corrobora com a literatura, onde a apigenina promoveu uma morte celular por apoptose com envolvimento mitocondrial em diferentes linhagens celulares (PATEL D, 2007; WANG *et al.*, 1999). Para melhor caracterizar o mecanismo de morte celular, foi avaliado se o tratamento de células HepG2 com apigenina induz fragmentação de DNA. Como mostrado na figura 23, as células HepG2 expostas à apigenina (100  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas tiveram um aumento (~30%) no conteúdo de células em SubG1, quando comparado ao controle (DNA fragmentado, representado como “A” na figura 23). Este resultado está de acordo com Chiang e colaboradores (2006) que mostraram que o tratamento de células HepG2 com apigenina (8  $\mu\text{g/mL}$  – 29,6  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas induz fragmentação do DNA (35%), resultado que também corrobora com Choi e colaboradores (2007), que observaram um aumento de 53% no conteúdo de DNA fragmentado após tratamento de células HepG2 com apigenina (20  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas.

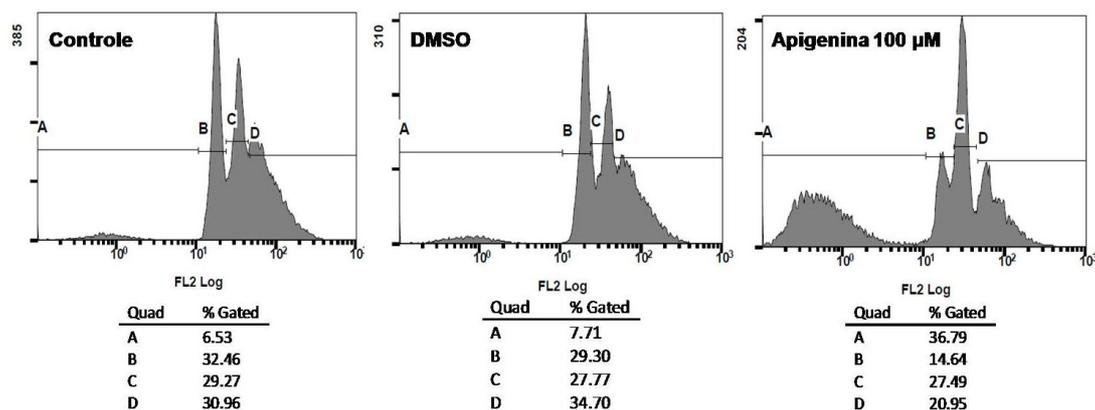


FIGURA 23 – EFEITOS DA APIGENINA SOBRE A FRAGMENTAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS HepG2

FONTE: O Autor (2012)

Nota: Análise da marcação com iodeto de propídio por citometria de fluxo foi realizada segundo o item 4.6 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com apigenina (100  $\mu$ M) por 24 horas. A porcentagem de células em SubG1, designados com A, foi definido com células com conteúdo de DNA fragmentado. Os histogramas representam três experimentos independentes em triplicata.

### 5.5.2. EFEITOS DA APIGENINA SOBRE A MORFOLOGIA EM CÉLULAS HepG2

A morfologia das células HepG2 após tratamento com apigenina (100  $\mu$ M) por 24 e 48 horas foi avaliada por coloração de hematoxilina e eosina. Pode-se observar na figura 24 (quadros **c** e **d**), que correspondem ao tratamento por 24 e 48 horas, respectivamente, que após o tratamento com apigenina as células HepG2 apresentaram alterações morfológicas, caracterizadas pela perda dos limites celulares e alterações no volume celular. Estes resultados estão em concordância com os efeitos citotóxicos apresentados pela apigenina, entretanto, para maiores detalhes morfológicos são necessários experimentos adicionais.

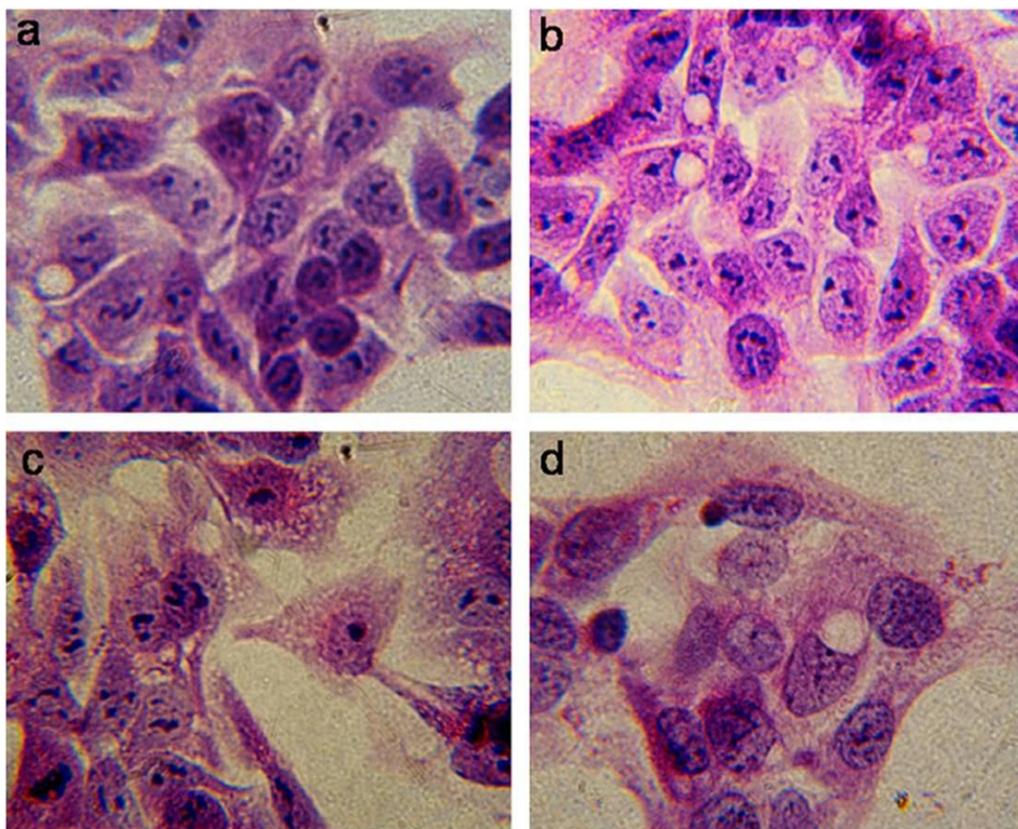


FIGURA 24 – EFEITOS DA APIGENINA NA MORFOLOGIA CELULAR

FONTE: O Autor (2012)

Nota: Análise morfológica de células HepG2 foi realizada segundo o item 4.11 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com apigenina (100  $\mu\text{M}$ ) por 24 e 48 horas. Análise foi realizada em microscópio óptico em aumento de 230X. (a) controle 24 horas, (b) controle 48 horas, (c) 100  $\mu\text{M}$  de apigenina por 24 horas e (d) 100  $\mu\text{M}$  de apigenina por 48 horas. Controles com DMSO não apresentaram diferenças. As fotos representam três experimentos independentes realizados em triplicata.

### 5.5.3. EFEITOS DA APIGENINA SOBRE OS NÍVEIS DE EROs EM CÉLULAS HepG2

Um dos mecanismos relacionados com a indução de apoptose por apigenina em células tumorais é o aumento de EROs. Para testar esta hipótese, células HepG2 foram tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de apigenina e a produção de EROs foi acompanhada por 4 horas fazendo uso da sonda fluorescente DCFDA. Como mostrado na figura 25, a apigenina apresentou um perfil de aumento na produção de EROs semelhante ao tratamento com o controle positivo,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (400  $\mu\text{M}$ ). Foi observado um aumento de ~25% nos níveis de EROs em células HepG2 nos primeiros 20 minutos de exposição com apigenina (100  $\mu\text{M}$ ), atingindo um platô após 1 hora de tratamento com a droga (figura 25).

Este resultado está de acordo com o obtido por Choi e colaboradores (2007), porém com intensidades diferentes. Estes autores, utilizando a mesma metodologia,

observaram um aumento de ~300% nos níveis de EROs em células HepG2 após exposição com apigenina (20  $\mu\text{M}$ ) por 1 hora. Estes resultados também corroboram com os obtidos em células de câncer de próstata após exposição com apigenina (20  $\mu\text{M}$ ) por 3 horas, onde foi observado um aumento nos níveis de EROs em ~50% (SHUKLA e GUPTA, 2008).

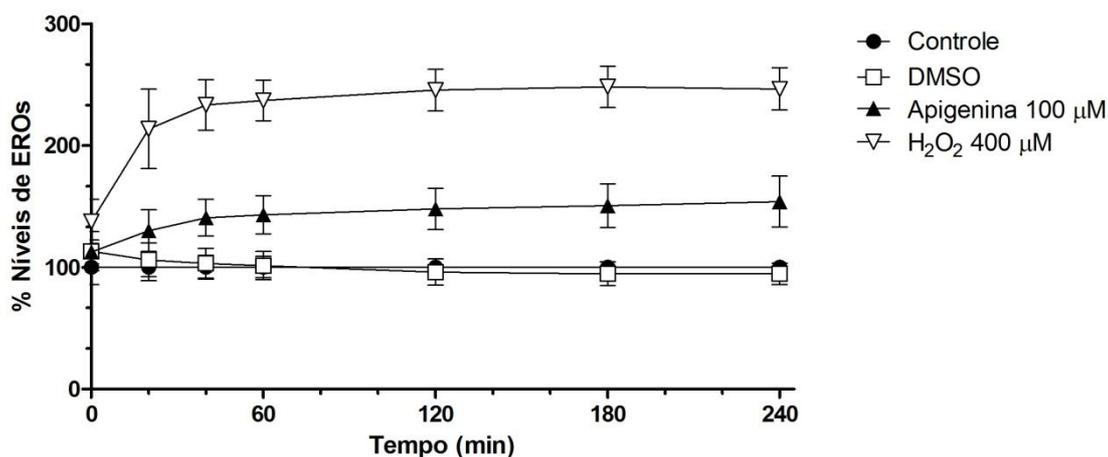


FIGURA 25 – EFEITOS DA APIGENINA SOBRE OS NÍVEIS DE ERO EM CÉLULAS HepG2  
 FONTE: O Autor (2012)

Nota: Monitoramento na formação de ERO em microplaca com uso da sonda DCFDA em células HepG2 foi realizada segundo o item 4.9 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com apigenina (100  $\mu\text{M}$ ). Análise foi realizada em microplaca de 96 poços, onde as células foram plaqueadas e deixadas aderir por 24 horas. Após esta etapa as células foram marcadas com DCFDA, lavadas e tratadas. Os dados representam a porcentagem da fluorescência em relação ao controle (normalizado para 100%). Os valores representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

#### 5.5.4. EFEITOS DA APIGENINA SOBRE A EXPRESSÃO DO mRNA E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS HepG2

Para manutenção do balanço redox celular, as células possuem várias defesas antioxidantes, como é o caso das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx1), glutathione redutase (Gred) (LAU *et al.*, 2008). Para melhor compreensão do envolvimento de EROs na morte celular induzida por apigenina em células HepG2, estas células foram tratadas com apigenina (100  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas e a seguir os níveis de expressão de mRNA e também a atividade das principais enzimas antioxidantes foram avaliados.

Os níveis de expressão da CAT, CuZnSOD, MnSOD, GPx1 e Gred foram avaliados por qRT-PCR. O nível de expressão relativo foi normalizado pelo programa geNorm 3.4, utilizando três genes de expressão constitutiva: HPRT, tubulina e

GAPDH. Como apresentado na figura 26A, o tratamento de células HepG2 com apigenina apenas afetou de forma significativa os níveis de expressão da catalase, diminuindo em aproximadamente 40% seus níveis de mRNA (figura 26A).

Para confirmar os resultados obtidos a nível transcricional, foi avaliado a atividade enzimática destas enzimas antioxidantes. Foi observado que o tratamento de células HepG2 com apigenina (100  $\mu$ M) por 24 horas promoveu uma diminuição significativa na atividade da catalase, quando comparado ao controle (figura 26B), porém com uma intensidade menor (redução de 20%), quando comparado a redução na expressão do mRNA desta enzima (figura 26A). Juntos estes resultados indicam que apigenina é capaz de modular negativamente tanto os níveis de expressão do mRNA da catalase quanto sua atividade. Estes dados corroboram com a literatura (SHUKLA e GUPTA, 2008) e sugerem que este fato pode contribuir para o aumento de EROs especialmente o  $H_2O_2$  e colaborar para a indução de morte celular por apoptose.

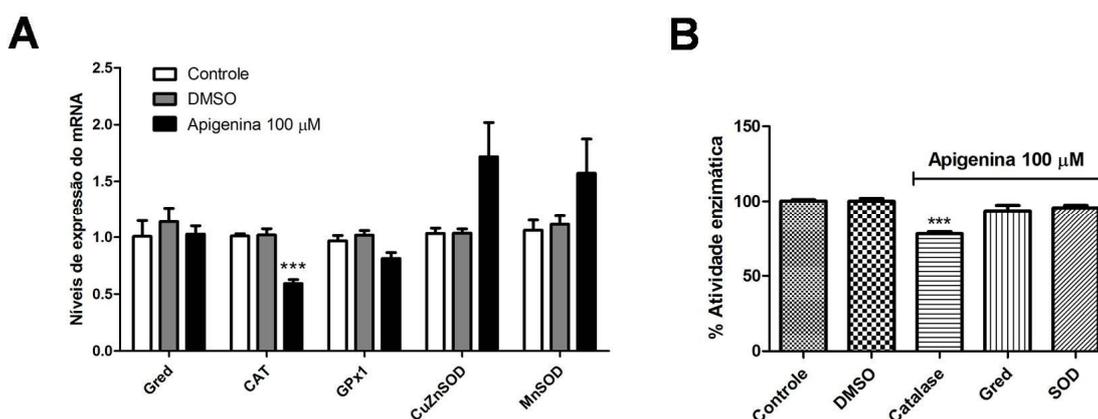


FIGURA 26 – EFEITOS DA APIGENINA NOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE mRNA E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES  
 FONTE: O Autor (2012)

Nota: (A) Quantificação dos níveis de mRNA das principais enzimas antioxidantes foi realizada segundo o item 4.15 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com apigenina (100  $\mu$ M) por 24 horas. Os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos realizados em triplicata. \*\*\*  $p < 0,005$ . (B) Efeito da exposição de células HepG2 a apigenina 100  $\mu$ M por 24 horas na atividade das enzimas antioxidantes. Os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos realizados em triplicata. A atividade das enzimas antioxidantes foi realizada segundo o item 4.16 de materiais e métodos. Para catalase, controle 100% corresponde a 0,853 nmol de  $H_2O_2$  consumido por minuto por  $\mu$ g de proteína. Para superóxido dismutase (SOD), controle 100% corresponde a 1 unidade de SOD (1 unidade de SOD corresponde a 50% de inibição da atividade). Para glutathiona redutase (Gred), controle 100% corresponde a 0,14 nmol de NADPH consumido por minuto por  $\mu$ g de proteína. \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 5.5.5. EFEITOS DA ADIÇÃO DE CATALASE EXÓGENA EM CÉLULAS HepG2 EXPOSTAS A APIGENINA

Para avaliar se as diminuições nos níveis de catalase estariam diretamente relacionadas aos efeitos de indução de morte celular induzido por apigenina, as células HepG2 foram submetidas simultaneamente ao tratamento com apigenina (100  $\mu$ M) e diferentes concentrações de catalase (100, 250, 500 e 1000 U/mL) por 24 horas. Como mostrado na figura 27A, adição de 500 ou 1000 unidades por mL de catalase resultou em uma proteção significativa da morte celular induzida por apigenina, de aproximadamente 20 e 30%, respectivamente, quando comparado ao controle.

Por outro lado, o tratamento concomitante de apigenina com antioxidantes como o BHA, BHT e ácido ascórbico não resultou em proteção da morte celular (figura 27B). Também foi observado que estes compostos (BHA, BHT e ácido ascórbico), quando utilizados sozinhos também induziram a morte em células HepG2 (figura 27B), resultados que estão de acordo com dados obtidos em células de leucemia humana (HL-60) (SAITO *et al.*, 2003). Estes resultados sugerem o envolvimento de  $H_2O_2$  na morte celular induzida por apigenina, uma vez que a adição de catalase, principal enzima responsável pela decomposição de  $H_2O_2$ , apresentou um efeito protetor em co-tratamento com a apigenina e que a adição de antioxidantes que não são seletivos para  $H_2O_2$  (LEE e JUNG, 2010) não foi eficiente em proteger a célula do desencadeamento do processo de morte celular.

Alguns autores têm demonstrado que a apigenina é capaz de induzir apoptose em diferentes linhagens celulares, incluindo células HepG2, através de uma via dependente de p53 e p21 (CHIANG LC, 2006; ZHENG *et al.*, 2005). Em um recente estudo foi demonstrado que o tratamento de células de câncer de próstata (linhagem 22Rv1), com  $H_2O_2$  ou apigenina, promove um aumento nos níveis de EROs, que induz um aumento de p53 e posteriormente de p21, com conseqüente ativação da via apoptótica, sendo essa indução de apoptose protegida pela adição de catalase exógena (SHUKLA e GUPTA, 2008). Estes resultados apoiam nossa hipótese de que o aumento intracelular de  $H_2O_2$  causado pelo tratamento com apigenina pode ser o responsável pela indução de apoptose.

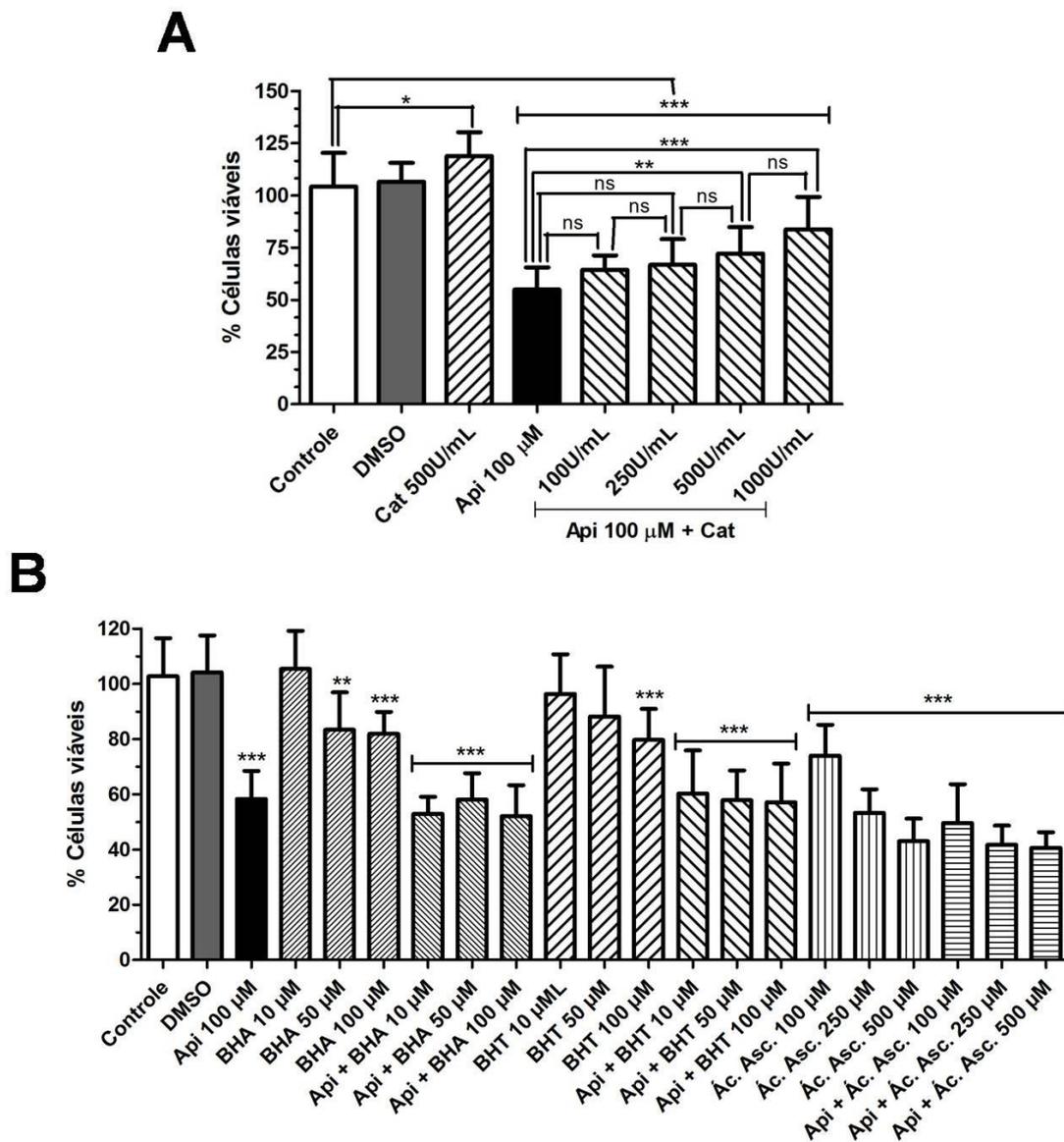


FIGURA 27 – EFEITOS DO CO-TRATAMENTO DE APIGENINA E ANTIOXIDANTES NA VIABILIDADE CELULAR

FONTE: O Autor (2012)

Nota: **(A)** Análise da viabilidade de células HepG2 foi realizada segundo o item 4.4.1 de materiais e métodos após exposição com a apigenina (100 µM), de maneira concomitante com diferentes concentrações de catalase por 24 horas. Os valores representam a porcentagem de células viáveis em relação ao controle. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . **(B)** Viabilidade de células HepG2 expostas a apigenina (100 µM), de maneira concomitante com diferentes concentrações de BHA, BHT e ácido ascórbico por 24 horas. Os valores representam a porcentagem de células viáveis em relação ao controle. Os dados representam a média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

## 5.6. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE ABCG2

As flavonas são estruturas promissoras para a atividade inibidora de transportadores ABC envolvidos na resistência a quimioterapia. Em um trabalho realizado no laboratório do Dr. Attilio Di Pietro, foram avaliadas diferentes classes de flavonóides (flavonas, flavonóis, isoflavonas e flavononas), sendo que dentre estas, as flavonas apresentaram os melhores resultados como inibidores de ABCG2 (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005b). Como as duas flavonas utilizadas no presente estudo para tratamento de células HepG2 (flavona e apigenina) já haviam sido previamente testadas quanto a sua capacidade de inibir os transportadores ABC, nesta segunda etapa do trabalho foi utilizada uma flavona anteriormente estudada em nosso laboratório (Laboratório de Oxidações Biológicas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR) em relação aos seus efeitos sobre a bioenergética mitocondrial, a hispidulina (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-6-metoxi-4H-1-benzopirano-4-ona) (DABAGHI-BARBOSA *et al.*, 2005). A única diferença estrutural da hispidulina *versus* apigenina é a presença de um grupo metoxi na posição C6, o que parece ser promissor quanto à capacidade de inibição de ABCG2 (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005b).

A segunda etapa deste trabalho, que teve como objetivo identificar novos inibidores de ABCG2, foi realizada durante estágio de doutoramento em Lyon (França) no laboratório de *Mécanisme et Modulation de La Résistance aux Médicaments* do *Institut de Biologie et Chimie des Protéines* (IBCP), sob orientação do Dr. Attilio Di Pietro. Para isso, foram utilizadas diferentes classes de compostos: flavonas (hispidulina), chalconas, cromonas e estilbenos.

### 5.6.1. EFEITOS DA HISPIDULINA

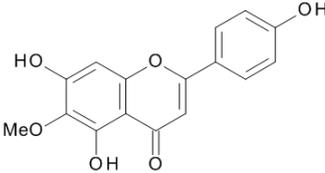
#### 5.6.1.1 EFEITOS DA HISPIDULINA COMO INIBIDOR DE ABCG2, P-gp e MRP1

Para avaliar a capacidade da hispidulina em inibir o transporte de substratos por ABCG2, foi utilizado um quimioterápico fluorescente (mitoxantrona) que é transportado tanto por ABCG2 quanto pela P-gp. Os níveis intracelulares de mitoxantrona foram monitorados por citometria de fluxo e o modelo utilizado foram células da linhagem HEK293 transfectadas de maneira estável para superexpressar ABCG2 (células HEK293ABCG2). Como apresentado na tabela 8, a hispidulina

apresentou um IC<sub>50</sub> de 19,5 µM, um valor superior, mas comparável ao apresentado pela apigenina (16 µM) (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005a), entretanto, aproximadamente 60 vezes superior ao observado para a 6-prenilcrisina (IC<sub>50</sub> de 0,33 µM) (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005a).

Para avaliar a seletividade da hispidulina em inibir ABCG2, o transporte dos substratos de P-gp e MRP1 (mitoxantrona e calceína, respectivamente) foram monitorados na presença de hispidulina. Os modelos utilizados foram células da linhagem HEK293 transfectadas de maneira estável para superexpressar P-gp (células HEK293ABCB1) e MRP1 (células HEK293ABCC1). Foi observado que a hispidulina (10 e 100 µM) não foi capaz de inibir o transporte destes substratos pela P-gp e MRP1, apresentando-se seletiva para ABCG2 (tabela 8). Este resultado está de acordo com os dados obtidos com as outras flavonas como a apigenina (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005a).

TABELA 8 - EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE ABCG2, P-gp E MRP1



**Hispidulina**

Concentração [µM]	% inibição de ABCG2	% inibição de P-gp	% inibição de MRP1
0,1	-6,0 ± 16,4	-	-
0,5	-9,8 ± 16,5	-	-
2,5	-4,1 ± 12,2	-	-
10	24,1 ± 8,8	-12,5 ± 13,5	-0,2 ± 0,3
50	102,2 ± 14,7	-	-
100	93,5 ± 17,3	-17,4 ± 6,4	0,9 ± 1,4
IC <sub>50</sub> = 19,5 ± 3,5	50	-	-

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Inibição do transporte de mitoxantrona (5 µM) em células HEK293ABCG2 e HEK293ABCB1. A porcentagem de inibição foi determinada usando o GF120918 (5 µM) como 100% de inibição. Os valores de porcentagem de inibição e o IC<sub>50</sub> foram determinados por citometria de fluxo como descrito na seção de materiais e métodos item 4.17. A última coluna representa a inibição do transporte de calceína (0,2 µM) em células HEK293ABCC1. A porcentagem de inibição foi normalizada usando as células HEK293 transfectadas com o vetor vazio (100% de inibição). Os resultados representam a média ± DP de dois experimentos independentes.

Os resultados observados com a hispidulina, somados aos resultados prévios do grupo do Dr. Attilio Di Pietro, nos motivaram a procurar novas classes de compostos mais promissoras como inibidores de ABCG2. Neste contexto, para identificar e caracterizar novos inibidores seletivos de ABCG2 foram avaliadas três diferentes classes de compostos; as chalconas, cromonas e estilbenos.

## 5.6.2. EFEITOS DAS CHALCONAS

Vários inibidores de ABCG2 já foram identificados, porém poucos apresentam potencial para testes clínicos. Na busca para identificar novos inibidores de ABCG2 foram avaliadas algumas chalconas (1,3-diarilpropenonas) e análogos como 1-indolil-3-fenilpropenonas e 1-fenil-3-indolilpropenonas (figura 28).

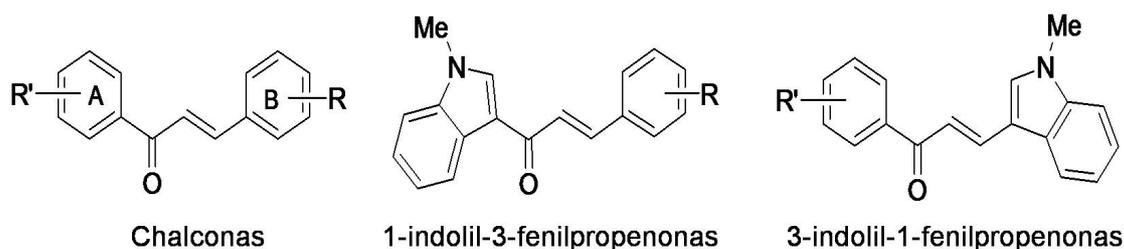


FIGURA 28 – ESTRUTURA BASE DAS CHALCONAS E ANÁLOGOS  
 FONTE: O Autor (2012)

### 5.6.2.1. EFEITOS DAS CHALCONAS COMO INIBIDORES DE ABCG2

Ao total foram testadas 34 chalconas e 10 análogos estruturais apresentando variações de três grupos substituintes em suas estruturas: metoxi (OMe), hidroxí (OH) ou etoxi (OEt). Foi utilizado o modelo de células HEK293ABCG2 e a capacidade destes compostos em inibir o transporte de mitoxantrona por ABCG2 foi avaliado por citometria de fluxo. Na tabela 9 estão representadas as estruturas das chalconas avaliadas, bem como a porcentagem de inibição de ABCG2 encontrada, utilizando concentrações das chalconas variando de 2 e 10  $\mu\text{M}$ . Para facilitar a apresentação e interpretação dos resultados, os compostos foram ranqueados em 5 classes de acordo com sua afinidade e inibição máxima:

Classe 1: Inibição completa (100%) em 2 e 10  $\mu\text{M}$  (alta afinidade –  $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$ )

Classe 2: Inibição máxima entre 50 e 75% com alta afinidade ( $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$ )

Classe 3: Inibição completa (100%) com baixa afinidade

Classe 4: Inibição parcial com baixa afinidade

Classe 5: Inibição muito baixa ou sem inibição

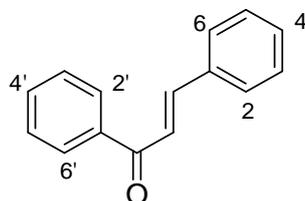
Os resultados para as chalconas estão apresentados na tabela 9 e para os análogos estruturais de chalconas na tabela 10. Como apresentado na tabela 9, as chalconas com grupos metoxi nas posições 2' e 6' do anel A são menos ativas (chalconas **1-7** = classe 5 e chalcona **8** = classe 4), independente do número e posição dos grupos metoxi no anel B. A substituição dos grupos metoxi nas posições

2' e 6' do anel A por etoxi, aparentemente não melhorou a atividade destes compostos como inibidores de ABCG2 (chalconas **9-11** = classe 4). Foi observado uma contribuição positiva, mudando o grupo metoxi da posição 6' do anel A, para a posição 4' (chalcona **12** = classe 2). Também foi observado que a presença de três grupos metoxi no anel A estão presentes em compostos com uma moderada atividade inibitória de ABCG2 (chalconas **13-15** = classe 4), enquanto que a mudança dos grupos metoxi por etoxi, aumenta essa atividade (chalcona **16** = classe 2) (tabela 9).

Compostos com a introdução de grupos hidroxí na posição 2' do anel A proporcionaram uma melhora considerável na inibição de ABCG2, passando as chalconas da classe 4 para classe 2 (chalconas **18-26**), enquanto que o melhor efeito inibidor de ABCG2 foi observado em compostos contendo a presença concomitante dos grupos hidroxí na posição 6' e grupos di-metoxi nas posições 2' e 4'. Esta distribuição de substituintes constitui a melhor disposição de grupos no anel A, uma vez que três das chalconas mais ativas (chalconas **27,28** e **31**), apresentam estes substituintes (tabela 9). A contribuição positiva do grupo hidroxí na posição 6' pode ser também observada quando comparamos as chalconas **1-8** (não ativas) com as chalconas **27-34**, ou ainda as chalconas **18-26** (tabela 9).

Em relação às substituições do anel B, foi observado que tanto a posição quanto o número de grupos metoxi foram importantes para discriminar os compostos com maior atividade inibitória de ABCG2. As chalconas com melhor atividade apresentam pares de grupos metoxi nas posições 2 e 6 (chalcona **27**) ou 3 e 5 (chalcona **28**), enquanto que compostos apresentando um único grupo metoxi na posição 3 (chalcona **31**) ou 2 (chalcona **30**) apresentaram melhor atividade quando comparado com compostos contendo ausência deste substituinte (chalcona **29**) (tabela 9). Por outro lado, observamos que a presença de um substituinte metoxi na posição 4 do anel B foi desfavorável para inibição de ABCG2, evidenciado quando comparamos as chalconas **32 versus 27** ou **33 versus 28** (tabela 9).

TABELA 9 – CLASSIFICAÇÃO DAS DIFERENTES CHALCONAS QUANTO A CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE MITOXANTRONA EM CÉLULAS HEK293ABCG2



Chalconas							% de inibição de ABCG2		Classe		
	2'	4'	6'	2	3	4	5	6		2 $\mu$ M	10 $\mu$ M
1	OMe		OMe						2,0 $\pm$ 0,61	2,6 $\pm$ 2,4	5
2	OMe		OMe	OMe					-0,9 $\pm$ 8,2	0,7 $\pm$ 7,7	5
3	OMe		OMe		OMe				-6,8 $\pm$ 9,4	1,9 $\pm$ 11,3	5
4	OMe		OMe	OMe				OMe	2,5 $\pm$ 13,6	6,7 $\pm$ 13,1	5
5	OMe		OMe	OMe		OMe		OMe	-0,9 $\pm$ 10,5	18,3 $\pm$ 15,6	5
6	OMe		OMe			OMe	OMe	OMe	2,7 $\pm$ 13,9	9,4 $\pm$ 13,3	5
7	OMe		OMe		OMe	OMe		OMe	2,7 $\pm$ 12,2	18,9 $\pm$ 18,0	5
8	OMe		OMe		OMe	OMe	OMe		13,0 $\pm$ 14,4	40,4 $\pm$ 19,6	4
9	OEt		OEt	OMe		OMe		OMe	22,1 $\pm$ 0,13	55,1 $\pm$ 11,7	4
10	OEt		OEt	OMe				OMe	1,3 $\pm$ 10,7	17,4 $\pm$ 12,7	4/5
11	OEt		OEt	OMe		OMe			21,2 $\pm$ 11,7	45,4 $\pm$ 13,3	4
12	OMe	OMe				OMe		OMe	42,6 $\pm$ 18,4	55,3 $\pm$ 13,4	2
13	OMe	OMe	OMe	OMe		OMe		OMe	16,7 $\pm$ 6,6	71,8 $\pm$ 11,4	4
14	OMe	OMe	OMe	OMe		OMe			11,9 $\pm$ 14,3	54,3 $\pm$ 17,4	4
15	OMe	OMe	OMe	OMe				OMe	11,5 $\pm$ 15,7	15,7 $\pm$ 9,4	4
16	OEt	OEt	OEt	OEt		OEt		OEt	37,0 $\pm$ 15,7	55,0 $\pm$ 11,2	2
17				OMe				OMe	0,02 $\pm$ 9,81	26,7 $\pm$ 10,2	4/5
18	OH	OMe			OMe		OMe		56,4 $\pm$ 13,7	63,2 $\pm$ 9,6	2
19	OH	OMe				OMe	OMe	OMe	44,7 $\pm$ 10,3	59,7 $\pm$ 9,0	2
20	OH	OMe				OMe	OMe		71,1 $\pm$ 10,3	76,5 $\pm$ 6,7	2
21	OH	OMe		OMe		OMe		OMe	45,9 $\pm$ 14,8	68,4 $\pm$ 12,4	2
22	OH	OMe					OMe	OMe	27,8 $\pm$ 15,1	48,5 $\pm$ 14,0	4
23	OH	OMe			OMe			OMe	47,5 $\pm$ 5,1	41,6 $\pm$ 23,1	2
24	OH	OMe			OMe	OMe	OMe		50,1 $\pm$ 19,8	101,2 $\pm$ 14,0	3
25	OH	OMe		OMe				OMe	58,2 $\pm$ 19,3	79,3 $\pm$ 13,8	2
26	OH	OMe				OMe		OMe	59,6 $\pm$ 11,1	54,7 $\pm$ 10,8	2
27	OMe	OMe	OH	OMe				OMe	130,7 $\pm$ 15,9	130,5 $\pm$ 12,6	1
28	OMe	OMe	OH		OMe		OMe		115,0 $\pm$ 16,7	117,9 $\pm$ 22,8	1
29	OMe	OMe	OH						67,9 $\pm$ 1,0	60,4 $\pm$ 17,2	2
30	OMe	OMe	OH	OMe					75,7 $\pm$ 8,9	93,1 $\pm$ 8,9	3
31	OMe	OMe	OH		OMe				93,0 $\pm$ 12,9	97,9 $\pm$ 2,2	1
32	OMe	OMe	OH	OMe		OMe		OMe	72,9 $\pm$ 6,9	90,0 $\pm$ 14,5	3
33	OMe	OMe	OH		OMe	OMe	OMe		72,5 $\pm$ 6,67	84,9 $\pm$ 10,7	2
34	OMe	OMe	OH			OMe	OMe	OMe	54,9 $\pm$ 11,1	95,0 $\pm$ 12,6	3

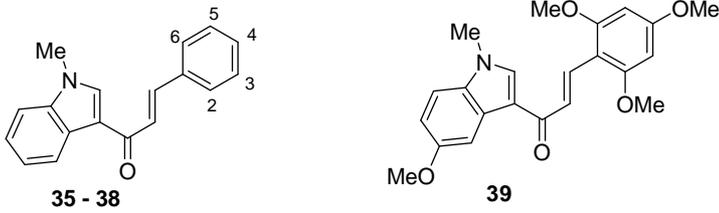
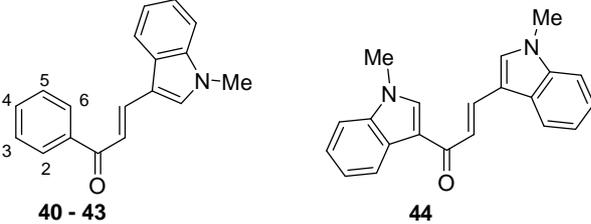
FONTE: O autor (2012)

NOTA: A porcentagem de inibição do transporte de mitoxantrona por ABCG2 foi determinada por citometria de fluxo como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.17. A porcentagem de inibição foi normalizada usando o inibidor de referência GF120918 (5  $\mu$ M), que inibe 100% do transporte. Os resultados representam a média  $\pm$  DP de pelo menos três experimentos independentes.

Também foram avaliados alguns compostos análogos indolil das chalconas como inibidores de ABCG2 (compostos **35-44**). Como apresentado na tabela 10, três

destes compostos (**37-39**) foram altamente ativos para atividade inibitória de ABCG2 e classificados como inibidores da classe 1. Quando comparado com a série de chalconas da tabela 10, fica evidente que a contribuição do grupo indolil foi crucial para a obtenção de compostos com maior atividade inibitória de ABCG2, sendo comparável o nível inibitório de atividade obtido com compostos contendo as substituições 2',4'-diOMe e 6'-OH no anel A. Entretanto, os resultados dos compostos análogos das chalconas com substituintes 3-indolil (compostos **40-43**) foram negativos, sendo ranqueados como classes 3, 4 ou 5. O último composto avaliado desta série foi o **44** (1,3-diindolilpropenona), que apresentou uma inibição moderada de ABCG2, sendo classificado como classe 3 (tabela 10).

TABELA 10 – INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE MITOXANTRONA POR INDOLILFENILPROPENONAS EM CÉLULAS HEK293ABCG2

Análogos das chalconas	Substituintes					% de inibição de ABCG2		Classe
	2	3	4	5	6	2 $\mu$ M	10 $\mu$ M	
								
<b>35</b>	OMe		OMe			83,8 $\pm$ 11,4	107,5 $\pm$ 8,7	3
<b>36</b>		OMe	OMe	OMe		49,3 $\pm$ 15,3	70,0 $\pm$ 16,4	3
<b>37</b>	OMe		OMe		OMe	93,8 $\pm$ 8,8	108,8 $\pm$ 11,4	1
<b>38</b>	OMe				OMe	103,5 $\pm$ 20,2	113,3 $\pm$ 11,9	1
<b>39</b>	-	-	-	-	-	89,08 $\pm$ 7,60	111,03 $\pm$ 4,48	1
								
<b>40</b>	OMe		OMe			88,2 $\pm$ 3,3	124,7 $\pm$ 16,7	3
<b>41</b>			OMe			55,5 $\pm$ 3,6	89,0 $\pm$ 11,4	3
<b>42</b>	OMe		OMe		OMe	3,7 $\pm$ 5,7	30,0 $\pm$ 13,4	4/5
<b>43</b>	OMe				OMe	2,9 $\pm$ 15,2	17,4 $\pm$ 14,8	4/5
<b>44</b>	-	-	-	-	-	52,1 $\pm$ 14,8	98,8 $\pm$ 17,0	3

FONTE: O autor (2012)

NOTA: A porcentagem de inibição do transporte de mitoxantrona por ABCG2 foi determinada por citometria de fluxo como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.17. A porcentagem de inibição foi normalizada usando o inibidor de referência GF120918 (5  $\mu$ M), que inibe 100% do transporte. Os resultados representam a média  $\pm$  DP de pelo menos três experimentos independentes.

Os resultados obtidos neste trabalho mostrando que as chalconas são potentes inibidores de ABCG2 estão de acordo com Han e colaboradores (2008) e Juvale e colaboradores (2012), que também discutem a importância de alguns substituintes distribuídos no núcleo básico das chalconas para atividade inibidora de ABCG2. Para melhor entender a relação estrutura-atividade de chalconas e seus análogos quanto a inibição de ABCG2, um estudo de 3D-QSAR, que permite fazer uma relação de estrutura-atividade de maneira quantitativa, foi realizado neste trabalho pela metodologia CoMFA (análise comparativa do campo molecular).

#### 5.6.2.2. MODELO MOLECULAR DA INIBIÇÃO DE ABCG2 PELAS CHALCONAS

As estruturas dos 44 compostos foram alinhados pelo anel base das chalconas (figura 29A) e inseridas em um banco de dados para o estudo de 3D-QSAR utilizando os valores de inibição de ABCG2 obtidos com a concentração de 2  $\mu$ M dos compostos. A análise comparativa do campo molecular está representada como contribuições positivas (amarela para estérica e vermelha para eletrostática) e negativas (verde para estérica e azul para eletrostática). Foi observado um efeito positivo do grupo hidroxil na posição 6', presente nos compostos **27**, **28** e **31** (tabela 9). Esse efeito positivo foi devido a contribuições eletrostáticas (volume vermelho), que também foi observado para o grupo metoxil na posição 5 (composto **28**) (figura 29B). Entretanto, os efeitos positivos dos grupos metoxil na posição 6 (compostos **27**, **37** e **38**) e 2' (compostos **27**, **28** e **31**) foram devido a contribuições estéricas (volume amarelo) (figura 29B). Em contraste, o grupo metoxil na posição 4 (composto **32 versus 27** e **33 versus 28**) apresentou um efeito eletrostático negativo (volume azul). (figura 29B). Também foi observado que o grupo *N*-metil-1-indolil dos análogos das chalconas não apresentou interações positivas, sugerindo que as interações hidrofóbicas são mais importantes para inibição de ABCG2.

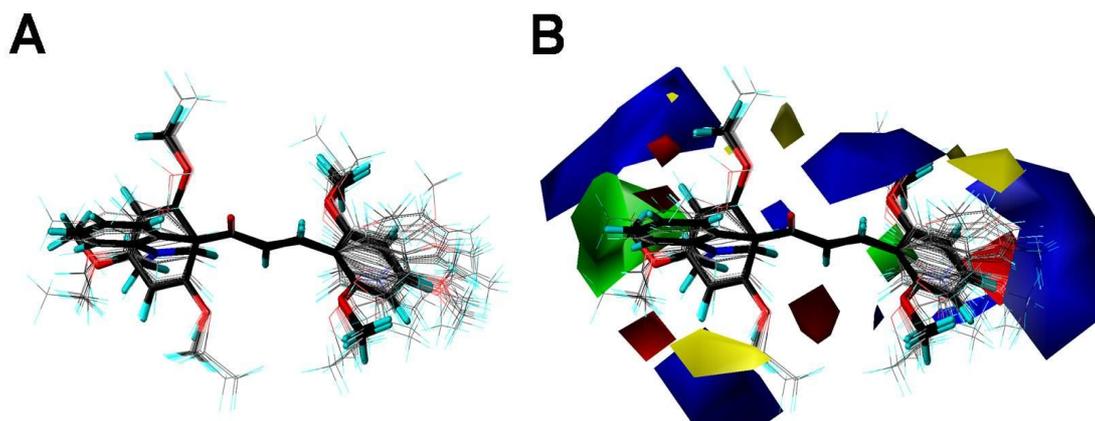


FIGURA 29 – MODELO MOLECULAR DAS CHALCONAS E ANÁLOGOS

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Análise de 3D-QSAR foi realizada como descrito na seção de Materiais e Métodos no item 4.22. (A) As 44 estruturas foram alinhadas e inseridas em um databank para o estudo de 3D-QSAR. (B) CoMFA – contribuição positiva (amarela para estérica e vermelha para eletrostática) - contribuição negativa (verde para estérica e azul para eletrostática).

Com base nos resultados acima descritos foram selecionados os 6 inibidores da classe 1 (compostos **27**, **28**, **31**, **37**, **38** e **39**), para avaliar se a inibição foi seletiva para ABCG2 ou se estes compostos também são capazes de inibir o transporte de substratos pelos outros dois transportadores ABC envolvidos na resistência a quimioterapia, P-gp e MRP1.

#### 5.6.2.3. EFEITOS DAS CHALCONAS COMO INIBIDOR DE P-gp (ABCB1) E MRP1 (ABCC1)

Foram utilizados os substratos mitoxantrona e calceína para P-gp e MRP1, respectivamente, e os modelos utilizados foram células da linhagem HEK293 transfectadas de maneira estável para superexpressar P-gp (células HEK293ABCB1) e MRP1 (células HEK293ABCC1). Em ambos os modelos, as células foram tratadas com os compostos nas concentrações de 2 e 10  $\mu\text{M}$ , como avaliado em ABCG2 e o transporte dos substratos foi monitorado por citometria de fluxo.

Como apresentado na figura 30A e 30B, as chalconas e seus análogos foram completamente seletivas para inibir o transporte de substrato via ABCG2, uma vez que mesmo utilizando a concentração de 10  $\mu\text{M}$  dos compostos nenhuma inibição foi observada tanto no transporte de mitoxantrona pela proteína P-gp quanto no transporte de calceína por MRP1 (figura 30).

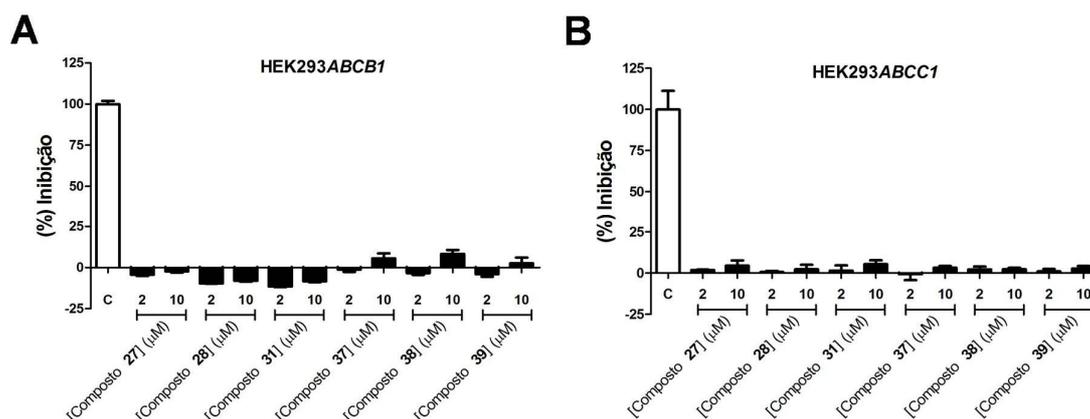


FIGURA 30 – SELETIVIDADE DAS CHALCONAS E ANÁLOGOS PARA INIBIR ABCG2 EM RELAÇÃO A P-gp (ABCB1) E MRP1 (ABCC1)

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) A inibição do transporte de mitoxantrona (5 μM) em células HEK293ABCB1 foi determinada por citometria de fluxo como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.17. O controle (100% inibição) foi realizado com células HEK293 transfectadas com o vetor vazio. (B) A inibição do transporte de calceína (0,2 μM) em células HEK293ABCC1 foi determinada por citometria de fluxo como descrito na seção de materiais e métodos. O controle (100% inibição) foi realizado com células HEK293 transfectadas com o vetor vazio. Os resultados para ambos os casos representam a média ± DP de dois experimentos independentes.

Das duas das principais características no desenvolvimento de novos inibidores dos transportadores ABC são: (i) apresentarem uma alta afinidade pelo transportador e (ii) apresentarem baixa citotoxicidade celular (BOUMENDJEL *et al.*, 2011), por isso, tornou-se importante determinar o  $IC_{50}$  de inibição (concentração necessária do composto para obter 50% da inibição máxima) e também o  $IG_{50}$  (concentração necessária do composto para obter 50% na redução de células viáveis) dos compostos.

#### 5.6.2.4. $IC_{50}$ DE INIBIÇÃO DE ABCG2 E CITOTOXICIDADE DAS CHALCONAS

Para comparar a eficácia das seis chalconas e seus análogos mais ativos, os valores de  $IC_{50}$  foram determinados (figura 31A e tabela11). Todos os compostos apresentaram valores de  $IC_{50}$  inferiores a 0,5 μM, sendo que a chalcona **28** foi a mais ativa, com um  $IC_{50}$  de 0,17 μM.

Também foi avaliada a citotoxicidade de cada um dos seis compostos em células HEK293ABCG2 e células controle HEK293 transfectadas com o vetor vazio, com a finalidade de determinar os valores de  $IG_{50}$  e avaliar uma possível *cross-resistance* (maior citotoxicidade em células HEK293 transfectadas com o vetor vazio quando comparado com células HEK293ABCG2, devido ao efluxo do composto). Como mostrado na figura 31B, a citotoxicidade de todos os compostos foi similar em ambas as linhagens celulares, sugerindo que as chalconas e seus análogos não são transportados por ABCG2 devido à falta de *cross-resistance*. Pode-se observar que os

valores de  $IG_{50}$  obtidos para os compostos são superiores aos de  $IC_{50}$ , entretanto, se compararmos os valores de  $IC_{50}$  entre os compostos não foi observado muita variação (0,17 – 0,45  $\mu\text{M}$ ), diferente do  $IG_{50}$ , onde foi observada uma grande diferença entre alguns compostos, chegando a uma diferença de 50 vezes quando comparamos o composto **39** com os compostos **27** e **38** (tabela 11). Os outros compostos (**28**, **31** e **37**) apresentaram valores de  $IG_{50}$  intermediários (tabela 11).

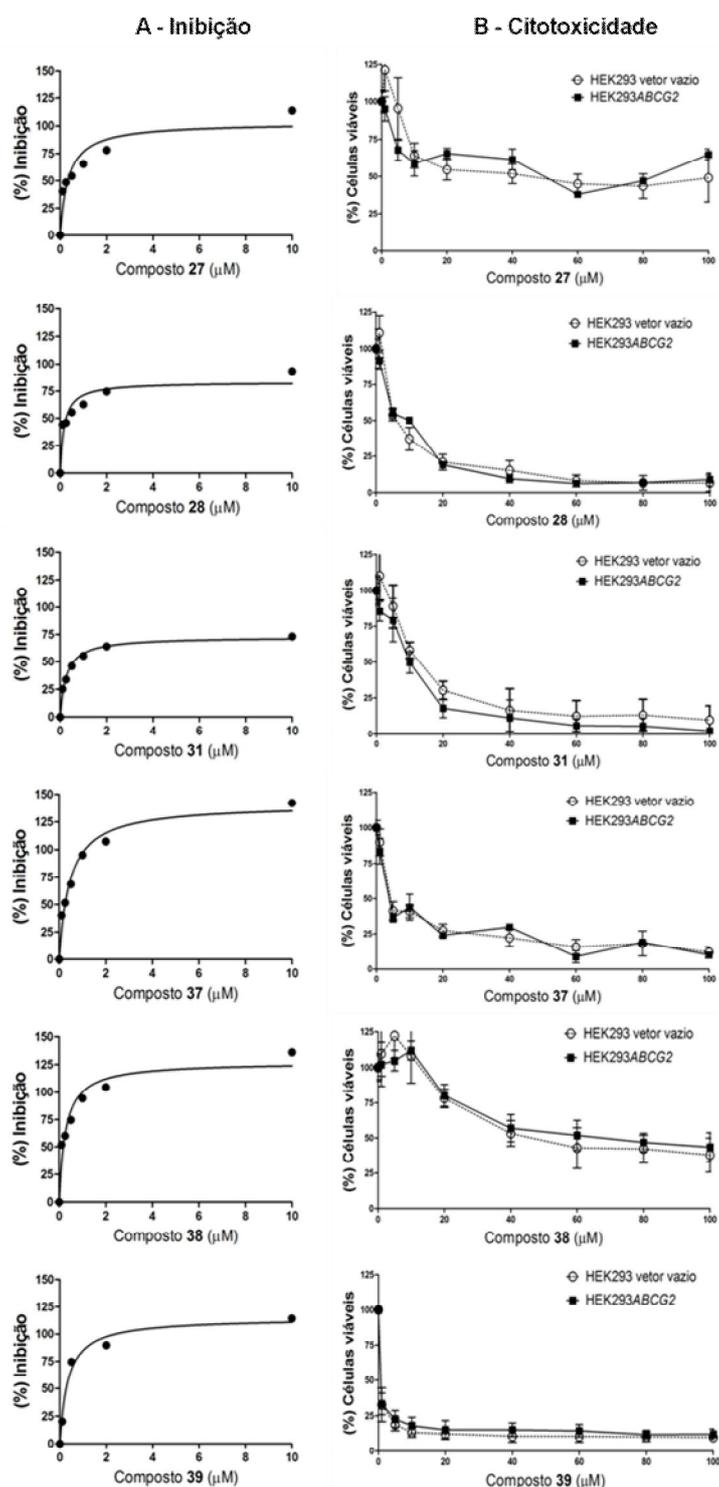


FIGURA 31 – IC<sub>50</sub> DE INIBIÇÃO DE ABCG2 E CITOTOXICIDADE DAS CHALCONAS

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) Curvas para determinar os valores de IC<sub>50</sub> de inibição do transporte de mitoxantrona em células superexpressando ABCG2. As curvas foram feitas usando o programa GraphPad Prism 5. (B) Viabilidade celular em células HEK293ABCG2 e HEK293 transfectadas com o vetor vazio após 72 horas de tratamento com os compostos **27**, **28**, **31**, **37**, **38** e **39** foi realizada como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.4.2. Os valores representam a média ± DP da porcentagem de células viáveis em relação ao controle tratado apenas com DMSO. Os dados correspondem ao menos dois experimentos realizados em triplicata.

Estes resultados de viabilidade celular nos apontam a importância dos grupos metoxi na posição 4 (compostos **39** e **37**), posição 3 (compostos **31** e **28**) e ainda posição 5 (compostos **28**) na indução de morte celular. Entretanto, compostos contendo grupos metoxi nas posições 3 e 5 apresentaram um duplo efeito, pois são responsáveis tanto por efeitos citotóxicos (figura 31B) quanto pela atividade inibitória de ABCG2 (tabela 9 e 10). Foi observado que compostos contendo grupos metoxi nas posições 2 e 6 não desencadearam elevada citotoxicidade (Figura 31B), bem como compostos contendo o grupo 1-indolil *versus* 1-fenil (**38 versus 27**).

Os resultados de citotoxicidade celular juntamente com os dados de inibição de ABCG2 nos permitem fazer uma razão de IG<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>, que chamamos aqui de ‘razão terapêutica’. Esta razão entre a citotoxicidade e o efeito inibidor é importante para identificar novos inibidores potentes e menos citotóxicos, dois parâmetros essenciais para futuros candidatos a ensaios *in vivo*. Baseados nesses dados de IG<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> apresentados na tabela 11, podemos sugerir que os melhores compostos inibidores de ABCG2 candidatos à futuros ensaios *in vivo* são os compostos **27** e **38**, com uma razão de 143 e 185, respectivamente.

TABELA 11 – VALORES DE IC<sub>50</sub> DE INIBIÇÃO DE ABCG2 E CITOTOXICIDADE DAS CHALCONAS E ANÁLOGOS

Compostos	IC <sub>50</sub> Inibição ( $\mu$ M)	IG <sub>50</sub> citotoxicidade ( $\mu$ M)	Razão terapêutica (IG <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
<b>27</b>	0.35 ± 0.14	50	143
<b>28</b>	0.17 ± 0.07	6	35
<b>31</b>	0.26 ± 0.04	10	38
<b>37</b>	0.45 ± 0.09	4	9
<b>38</b>	0.27 ± 0.08	50	185
<b>39</b>	0.35 ± 0.09	1	3

FONTE: O autor (2012)

NOTA: IC<sub>50</sub> é igual a concentração necessária para obter 50% de inibição máxima no transporte de mitoxantrona por ABCG2. IG<sub>50</sub> é igual a concentração necessária para obter 50% na redução de células viáveis.

#### 5.6.2.5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM AS CHALCONAS E ANÁLOGOS

Tem sido descrito que algumas chalconas halogenadas se fixam em P-gp (BOIS *et al.*, 1998) e são capazes de inibir o transporte de substratos por esse transportador (LIU *et al.*, 2008). Compostos da classe das chalconas também foram previamente descritos como inibidores de ABCG2 e foi mostrada a importância de alguns substituintes no anel A para essa atividade (HAN *et al.*, 2008).

Recentemente foi demonstrada a relação estrutura-atividade de algumas chalconas na inibição do transporte de Hoechst 33342 usando células MCF-7-MX e células MDCK superexpressando ABCG2 (Juvale *et al.*, 2012). A seletividade de inibição de ABCG2 observada neste trabalho, quando comparado com a P-gp e MRP1, está de acordo com os dados obtidos por Juvale *et al.*, (2012) e Han *et al.*, (2008). Também, algumas das características estruturais importantes encontradas nos diferentes compostos capazes de inibir ABCG2 identificadas por Juvale e colaboradores (2012) e Han e colaboradores (2008), também foram observadas neste trabalho, como por exemplo, compostos contendo substituintes na posição 2' do anel A. Entretanto, Juvale e colaboradores (2012) identificaram como positiva a presença de substituintes na posição 4' do anel A, resultado que não está de acordo com os dados obtidos neste trabalho e talvez possa explicar porque a chalcona **31** (sem o grupo metoxi na posição 4') foi 2 a 3 vezes mais eficiente em inibir ABCG2 que a melhor chalcona identificada por Juvale *et al.*, (2012). Outra diferença importante identificada neste trabalho foi que compostos contendo o grupo indolil apresentaram efeitos positivos para inibição de ABCG2, ao contrário do observado por Juvale *et al.*, (2012) com compostos contendo o grupamento naftil.

Em resumo, estes dados de relação estrutura-atividade das diferentes chalconas e seus análogos mostraram que: (i) o grupo metoxi na posição 2' do grupo 1-fenil contribui positivamente na atividade inibitória de ABCG2 através de efeitos estéricos, e quando um hidroxí está presente na posição 6' a inibição de ABCG2 aumenta; (ii) os dois grupamentos metoxi nas posições 2 e 6 do grupo 3-fenil também contribuem para a inibição de ABCG2, sem um efeito aparente na citotoxicidade; (iii) os dois grupamentos metoxi nas posições 3 e 5 contribuem fortemente para inibição de ABCG2, porém também são responsáveis por aumentar os efeitos citotóxicos destas chalconas; (iv) o grupamento metoxi na posição 4' não contribui para inibição de ABCG2, por apresentar efeitos estéricos negativos e (v) o grupamento metoxi na posição 4 é completamente desfavorável, tanto para inibição de ABCG2 (por promover

efeitos negativos, tanto estéricos quanto eletrostáticos), quanto por aumentar a citotoxicidade destes compostos.

Esses resultados sugerem que as chalconas e seus análogos estruturais identificados nesse trabalho, principalmente os compostos **27** e **38** são candidatos promissores para testes *in vivo* como inibidores de ABCG2, apresentando requisitos fundamentais como a seletividade, alta afinidade pelo transportador e em alguns casos uma baixa citotoxicidade quando comparado a outros inibidores de ABCG2 já identificados, como é o caso da 6-prenilcrisina, que apresenta um  $IG_{50}$  de aproximadamente 10  $\mu$ M (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005b; BOUMENDJEL *et al.*, 2011).

### 5.6.3. CROMONAS

Um dos inibidores de referência de ABCG2 é o GF120918 (figura 32), entretanto, esse composto também inibe o transporte de substratos pela P-gp (BOUMENDJEL *et al.*, 2011). Usando como base estrutural o GF120918, o grupo do Dr. Attilio Di Pietro identificou uma serie de novos inibidores seletivos de ABCG2 (BOUMENDJEL *et al.*, 2007b). O melhor inibidor de ABCG2 desta série de compostos baseados no núcleo básico das acridonas foi o MBLI-87 (figura 32A), que foi identificado *in vitro* e posteriormente testado *in vivo*, que apesar de sua toxicidade apresentou efeitos promissores (ARNAUD *et al.*, 2011).

Para continuar a busca de novos inibidores de ABCG2 com maior afinidade e menor toxicidade, o anel base das acridonas do GF120918 (figura 32A) foi substituído pelo anel base das cromonas (figura 32B), sendo que a escolha dos substituintes dispostos nesse anel teve como objetivo aumentar o potencial de inibição de ABCG2 e também diminuir a citotoxicidade destes compostos.

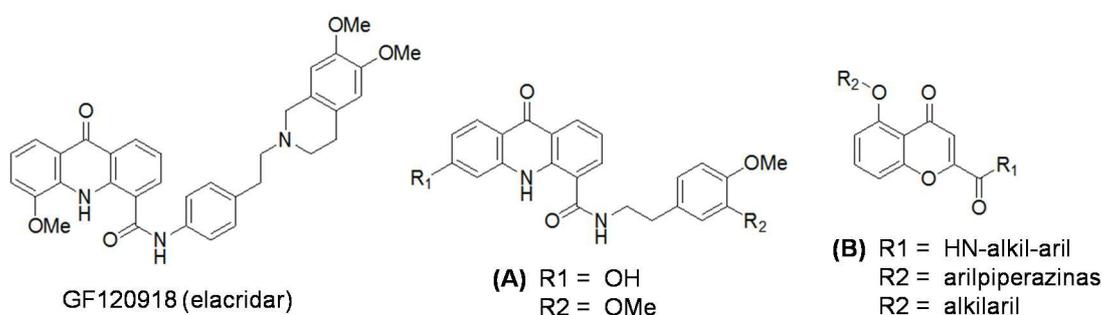


FIGURA 32 –  $IC_{50}$  GF120918, anel básico das acridonas e cromonas  
 FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Estratégia utilizada na busca de inibidores mais potentes de ABCG2 a partir do GF120918 (**A**) Anel básico das acridonas (**B**) Anel básico das cromonas.

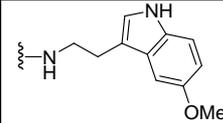
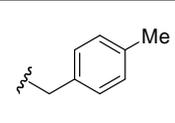
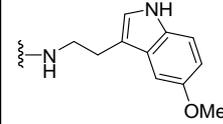
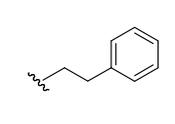
### 5.6.3.1. EFEITOS DAS CROMONAS COMO INIBIDORES DE ABCG2

Para avaliar o potencial das cromonas em atuar como inibidores do transporte de substratos por ABCG2, o transporte de mitoxantrona em células HEK293ABCG2 foi monitorado por citometria de fluxo. No total foram testadas 13 cromonas quanto a sua capacidade de inibir o transporte de mitoxantrona por ABCG2, sendo que as concentrações utilizadas foram de 1 e 5  $\mu\text{M}$  por se tratarem de inibidores de segunda geração (derivados das acridonas), os quais apresentam alta afinidade por ABCG2, o que permite o uso de concentrações menores destes compostos. Os resultados de inibição de ABCG2 estão apresentados na tabela 12, onde estão indicados os substituintes utilizados, tanto na posição  $R_1$  quanto  $R_2$ . Os resultados mostram que apenas o anel básico das cromonas, ou seja, sem substituintes (cromona **1**), não foi capaz de inibir o transporte de mitoxantrona por ABCG2, entretanto, quando substituída ou em  $R_1$  (cromonas **2a** e **2b**), ou em  $R_2$  (cromona **5a**) foi observado um leve efeito inibidor de ABCG2 (tabela 12). A inibição promovida pela cromona **5a** sugere que o grupo carboxil não impede a passagem do composto através da membrana plasmática, entretanto, não exclui a possibilidade de que a cromona **1** não é capaz de atravessar a membrana e assim não se fixa em ABCG2 (tabela 12).

Entre os compostos avaliados observa-se que para obter uma inibição completa do transporte de mitoxantrona por ABCG2, o inibidor precisa ser substituído de ambos os lados da estrutura ( $R_1$  e  $R_2$ ), como no caso da cromona **6a**, qual possui uma alta afinidade por ABCG2 ( $\text{IC}_{50} = 0,17 \mu\text{M}$ ). Importante ressaltar que a natureza do substituinte em  $R_1$  é crítica para inibição de ABCG2. Esse resultado pode ser visualizado ao comparar o grupo dimetoxifeniltilamina (cromona **6a**) com o grupo fenilpepirazina (cromona **6b**), ou piridilpiperazina (cromona **6c**), ou ainda por benzilpiperazina (cromona **6d**), entretanto, o grupo metoxitriptamina (cromona **6f**) mostrou-se tão eficiente quanto a dimetoxifeniltilamina (cromona **6a**) (tabela 12).

A natureza dos substituintes em  $R_2$  também foi de grande importância para obter compostos com atividade inibitória de ABCG2, como observado pela introdução de um bromo no composto cromona **6g**, qual foi positivo para inibição de ABCG2 [cromona **6g** ( $\text{IC}_{50} = 0,11 \mu\text{M}$ ) *versus* **6f** ( $\text{IC}_{50} = 0,18 \mu\text{M}$ ) ou **6h** ( $\text{IC}_{50} = 0,20 \mu\text{M}$ )], provavelmente devido ao tamanho do halogênio ou hidrofobicidade do grupo nessa posição da molécula (tabela 12).



<b>6h</b>			99,2 ± 14,0	113,3 ± 12,4	0,20
<b>6i</b>			101,4 ± 10,3	120,4 ± 5,5	0,16

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Inibição do transporte de mitoxantrona em células superexpressando ABCG2 foi realizada como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.17. A porcentagem de inibição foi determinada em relação ao inibidor de referência GF120918 (5 µM), qual é capaz de inibir 100% do transporte. Os valores representam a média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

### 5.6.3.2. EFEITOS DAS CROMONAS COMO INIBIDORES DE P-gp (ABCB1) E MRP1 (ABCC1) E COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS DAS ACRIDONAS

A próxima etapa do trabalho foi avaliar se os sete inibidores do transporte de mitoxantrona por ABCG2, os quais o seu IC<sub>50</sub> de inibição foi determinado (tabela 12), também inibem o transporte de substratos pela P-gp e MRP1. Os substratos utilizados neste ensaio foram a mitoxantrona e calceína para P-gp e MRP1, respectivamente, e os modelos utilizados foram células da linhagem HEK293 transfectadas de maneira estável para superexpressar P-gp (células HEK293ABCB1) e MRP1 (células HEK293ABCC1). Os resultados visualizados na tabela 13 mostram que todos os compostos foram específicos para inibir ABCG2, uma vez que não inibiram o transporte de mitoxantrona pela P-gp (tabela 13) e de calceína por MRP1 (tabela 13), mesmo na dose de 5 µM dos compostos, que corresponde aproximadamente uma concentração 45 vezes maior que o IC<sub>50</sub> de inibição de ABCG2 apresentado pela cromona **6g**.

TABELA 13 – SELETIVIDADE DAS CROMONAS PARA INIBIR ABCG2 EM RELAÇÃO A P-GP (ABCB1) E MRP1 (ABCC1)

Cromonas	P-gp HEK293ABCB1		MRP1 HEK293ABCC1	
	(% Inibição)			
	1 µM	5 µM	1 µM	5 µM
<b>2a</b>	-20.46 ± 16.22	-29.01 ± 18.93	3.37 ± 4.60	5.47 ± 5.32
<b>6a</b>	-25.47 ± 33.60	-22.95 ± 15.06	10.79 ± 5.47	12.71 ± 4.25
<b>6e</b>	-16,56 ± 3.30	-0.11 ± 1.48	5.57 ± 4.40	10.75 ± 6.26
<b>6f</b>	-9.11 ± 1.35	-19.42 ± 4.98	1.91 ± 1.88	5.14 ± 4.25
<b>6g</b>	-1.75 ± 1.07	-16.06 ± 1.28	2.58 ± 1.94	2.86 ± 1.83
<b>6h</b>	-4.29 ± 3.26	-21.87 ± 0.68	1.13 ± 1.08	3.09 ± 1.94
<b>6i</b>	-13.99 ± 1.42	-14.8 ± 3.61	2.36 ± 2.52	5.12 ± 4.72

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: A inibição do transporte de mitoxantrona (5 µM) em células HEK293ABCB1 foi determinada por citometria de fluxo como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.17. O controle (100% inibição) foi realizado usando GF120918 (5 µM). A inibição do transporte de calceína (0,2 µM) em células

HEK293ABC1 foi determinada por citometria de fluxo. O controle (100% inibição) foi realizado com células HEK293 transfectadas com o vetor vazio. Os resultados para ambos os casos representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes.

A idéia de testar cromonas como inibidores de ABCG2 surgiu a partir dos estudos realizados com as acridonas, previamente descritas como inibidores de ABCG2, tanto em modelos *in vitro* (BOUMENDJEL *et al.*, 2007b) quanto *in vivo* (ARNAUD *et al.*, 2011). Entretanto, as acridonas foram sintetizadas a partir do GF120918, que inibe tanto ABCG2 quanto P-gp, porém a seletividade destas acridonas ainda não tinha sido testada para P-gp, mas apenas para MRP1. Ao obter cromonas específicas para ABCG2, o efeito das acridonas sobre o transporte de mitoxantrona pela P-gp também foi avaliado. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as acridonas **4a** e **4b** não inibem o transporte de mitoxantrona pela P-gp, enquanto as acridonas **4c** e **4d** inibem parcialmente esse transporte (figura 33B). Esses resultados comparativos de acridonas *versus* cromonas sugerem duas vantagens das cromonas: (i) maior potência de inibição de ABCG2 e (ii) maior seletividade.

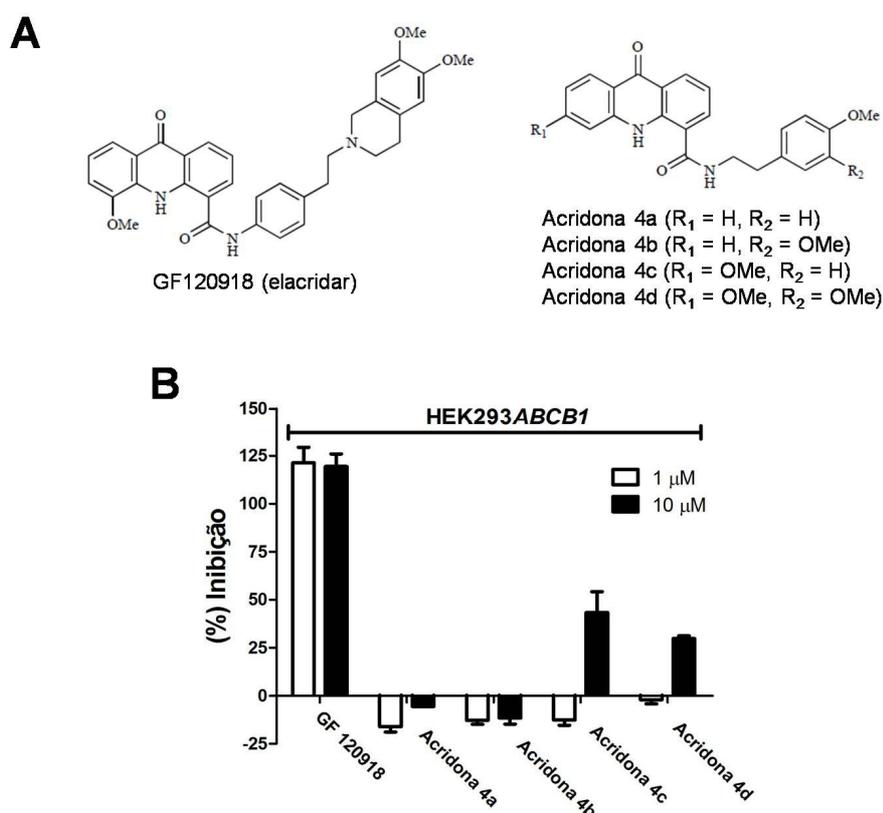


FIGURA 33 – ESTRUTURAS DAS ACRIDONAS E INIBIÇÃO DE P-gp (ABCB1)

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) Estruturas das acridonas previamente descritas como inibidores de ABCG2 (B) A inibição do transporte de mitoxantrona (5  $\mu$ M) em células HEK293ABC1 foi determinada por citometria de fluxo como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.17. O controle (100% inibição) foi realizado usando GF120918 (5  $\mu$ M).

### 5.6.3.3. CITOTOXICIDADE DAS CROMONAS

O ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT foi realizado em células HEK293ABCG2 e células HEK293 transfectadas com o vetor vazio após 72 horas de tratamento com as cromonas **6a**, **6f**, **6g**, **6h** e **6i**. Como pode-se observar na figura 34, entre as cromonas testadas, o composto **6g** (também o melhor inibidor), apresentou uma baixa citotoxicidade, reduzindo em aproximadamente 25% a viabilidade de ambas as linhagens celulares na maior concentração testada (100  $\mu\text{M}$ ) (figura 34).

Foi observado que a presença do bromo na cromona **6g** foi de extrema importância para os efeitos citotóxicos, uma vez que a cromona **6f** apresentou uma maior citotoxicidade ( $\text{IG}_{50} = 35 \mu\text{M}$ ) quando comparado com os demais compostos. Foram observados efeitos citotóxicos intermediários pelas cromonas **6h** (grupo metilbenzil) e **6i** (grupo feniletil) (figura 34). O grupamento dimetoxifeniletamina na posição  $\text{R}_1$  da cromona **6a** (também presente em acridonas), foi responsável por uma maior citotoxicidade, especialmente quando comparamos os compostos **6a** versus **6f** em baixas concentrações (figura 34). Pode-se concluir que ambos os substituintes em  $\text{R}_1$  (metoxitriptamina) e  $\text{R}_2$  (bromobenzil) contribuem para os efeitos sobre a viabilidade celular. Outro resultado importante é que nenhum dos compostos foi mais citotóxico em células transfectadas com o vetor vazio (células controle) em comparação com a linhagem transfectada com a construção contendo o transportador ABCG2, sendo que essa falta de *cross-resistance* sugere a ausência de transporte por ABCG2 (figura 34). Estes resultados estão de acordo com os obtidos para outros compostos inibidores de ABCG2, como as flavonas (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005a) e acridonas (BOUMENDJEL *et al.*, 2007a), que também não apresentaram *cross-resistance*.

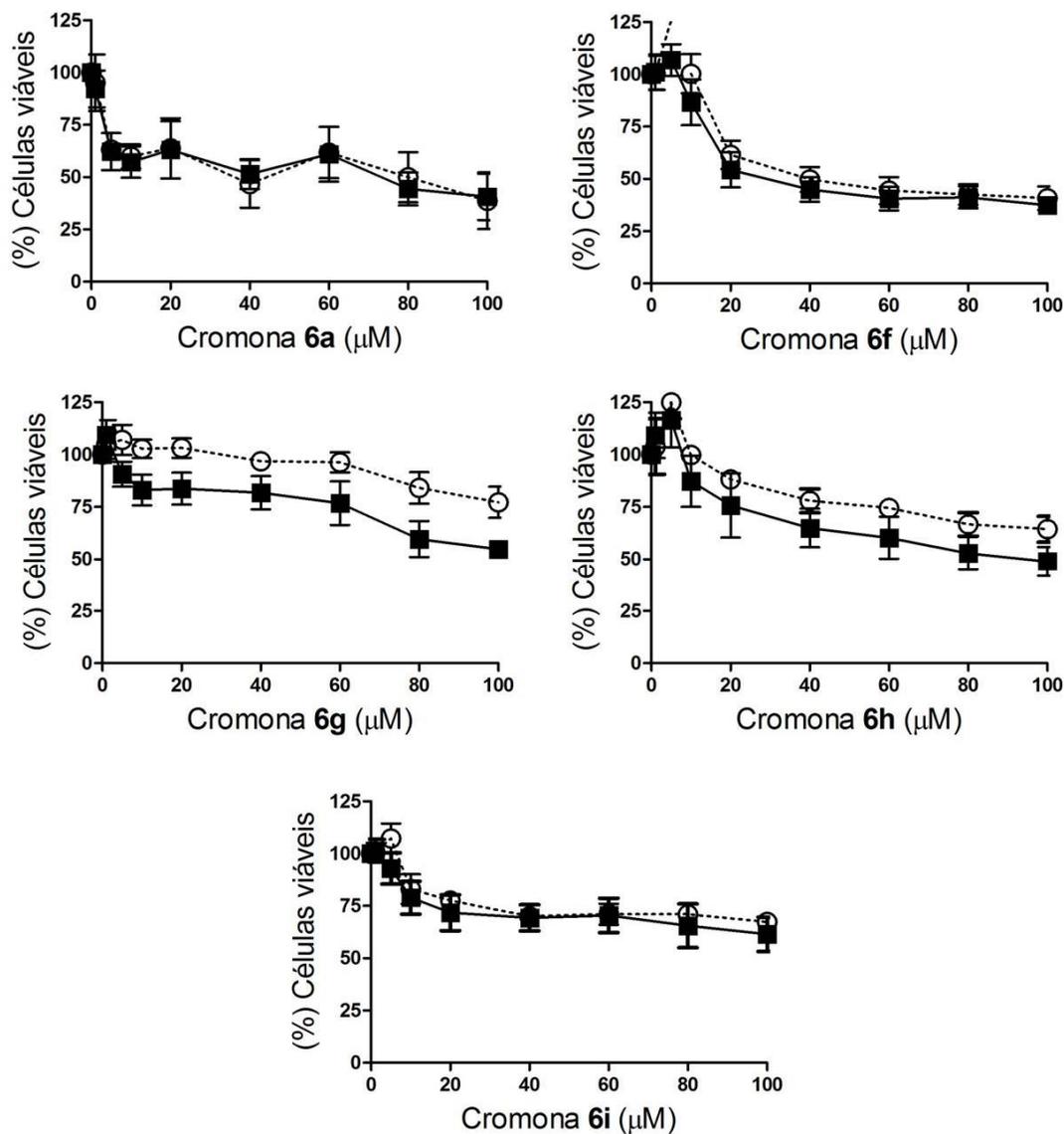


FIGURA 34 – CITOTOXICIDADE DAS CROMONAS  
 FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Viabilidade celular em células HEK293ABCG2 (■) e HEK293 transfectadas com o vetor vazio (○) após 72 horas de tratamento com as cromonas identificadas nas figuras foi realizado de acordo com a seção de Materiais e Métodos item 4.4.2. Os valores representam a média  $\pm$  DP da porcentagem de células viáveis em relação ao controle tratado apenas com DMSO. Os dados correspondem ao menos dois experimentos realizados em triplicata.

Devido a falta de *cross-resistance* observada no ensaio de viabilidade celular, foi sugerido que esses novos inibidores não são transportados por ABCG2, entretanto, para confirmar esse resultado, foi realizado um ensaio por HPLC-MS/MS para determinar a quantidade intracelular de cada um dos compostos.

#### 7.1.3.4. QUANTIDADE INTRACELULAR DAS CROMONAS EM CÉLULAS HEK293 SUPEREXPRESSANDO ABCG2

A quantidade intracelular das cromonas **6g** e **6a** foi determinada por HPLC-MS/MS tanto em células HEK293 superexpressando ABCG2, quanto em células HEK293 controle, transfectadas com o vetor vazio. Como apresentado na figura 35, não foi observada diferença significativa na quantidade intracelular destes compostos após exposição por 30 minutos, quando comparado o tratamento de células transfectadas com o vetor vazio com o tratamento de células superexpressando ABCG2. Esses resultados confirmam a sugestão prévia de ausência de transporte mediado por ABCG2 para essa nova classe de inibidores.

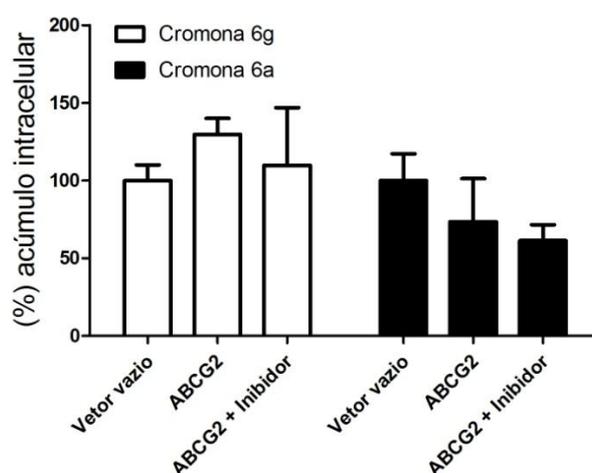


FIGURA 35 – TRANSPORTE DAS CROMONAS POR ABCG2

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: As cromonas **6g** e **6a** foram incubados na concentração de 2  $\mu$ M e a quantidade intracelular foi determinada por HPLC-MS/MS como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.19. Os resultados em porcentagem foram normalizados usando as células transfectadas com o vetor vazio como controle (100%). No caso de transporte, foi realizado um controle usando um inibidor de referência (GF120918 – 5  $\mu$ M). A quantidade de cada composto em células HEK293ABCG2 foi: **6a** ( $826.8 \pm 142.7$  pg/mg.prot.) e **6g** ( $15.9 \pm 1.6$  ng/mg.prot.).

#### 5.6.3.5. AÇÃO DAS CROMONAS NA SENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM ABCG2 PELAS CROMONAS

Foram identificadas duas cromonas (**6g** e **6a**) como potentes inibidores seletivos de ABCG2, apresentando uma baixa citotoxicidade e ausência de transporte por este transportador (figura 34 e 35). Contudo, os testes de inibição do transporte de mitoxantrona por ABCG2 foram realizados em um curto período de incubação (30

minutos) (tabela 12). Para ampliar os resultados obtidos com esses compostos e verificar se estas cromonas são capazes de reverter a resistência ao tratamento com quimioterápicos, foi realizado um ensaio de viabilidade celular onde, tanto as células que superexpressam ABCG2 (HEK293ABCG2), quanto as células HEK293 transfectadas com o vetor vazio, foram tratadas com mitoxantrona ou SN-38 (quimioterápicos utilizados na clínica). As células HEK293ABCG2 também foram co-tratadas com as cromonas **6g** e **6a** nas concentrações de 0,2 e 1  $\mu$ M. Como observado na figura 36A e 36B, tanto o tratamento com mitoxantrona quanto com SN-38 promovem diminuição da viabilidade de células HEK293, apresentando um efeito dose-dependente. O co-tratamento de mitoxantrona com a cromona **6g** foi capaz de reverter o fenótipo de resistência (figura 36A). O mesmo resultado foi observado quando o quimioterápico mitoxantrona foi substituído por SN-38 (figura 36B). Pode-se observar nas figuras 36C e 36D que a cromona **6a**, apresentou o mesmo perfil, sendo capaz de sensibilizar as células que superexpressam ABCG2 aos dois quimioterápicos utilizados (mitoxantrona e SN-38).

Foi observado que na concentração de 0,2  $\mu$ M, ambos os inibidores (cromonas **6g** e **6a**) foram eficientes em reverter a resistência aos quimioterápicos utilizados, resultado que corrobora com os valores de  $IC_{50}$  apresentados na tabela 12, sugerindo que esses compostos não sofrem degradação ou foram metabolizados após 72 horas de tratamento. Vale lembrar que nessa concentração estes compostos não apresentaram efeitos citotóxicos após 72 horas de tratamento.

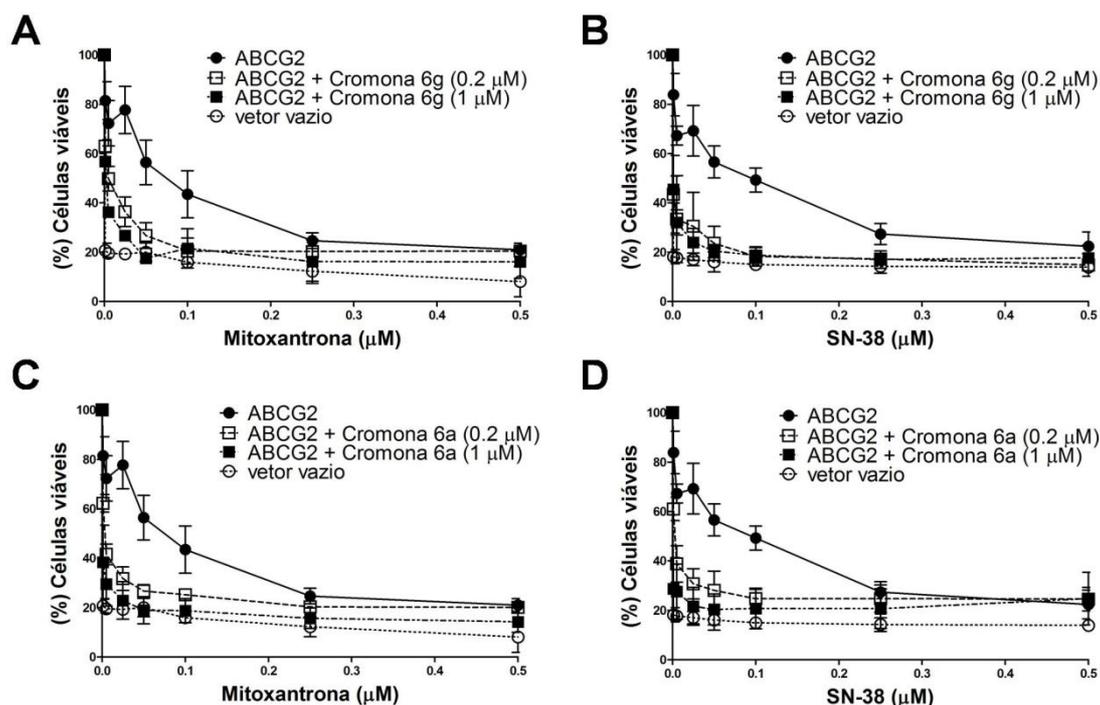


FIGURA 36 – SENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS SUPEREXPRESSANDO ABCG2 PELAS CROMONAS

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Reversão da resistência a mitoxantrona e SN-38 em células superexpressando ABCG2. A viabilidade celular em células HEK293 transfectadas como o vetor vazio e em células HEK293ABCG2 na presença dos quimioterápicos mitoxantrona e SN-38 foi realizada após 72 horas de tratamento pelo método do MTT como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.4.2. Nas mesmas condições células HEK293ABCG2 foram co-tratadas com as cromonas **6g** e **6a**. Os valores representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Os resultados representam a porcentagem das células viáveis em relação ao controle sem tratamento.

#### 5.6.3.6. EFEITO DAS CROMONAS SOBRE A EXPRESSÃO DE ABCG2

Alguns inibidores de ABCG2 quando utilizados por longos períodos de incubação podem diminuir a expressão do transportador e assim consequentemente diminuir o transporte de substratos, por isso, torna-se importante monitorar os níveis de expressão do transportador na presença destes novos inibidores.

Para avaliar essa hipótese, os níveis de expressão de ABCG2 na presença das cromonas **6g** e **6a** foram monitorados após 72 horas de exposição. Como apresentado na figura 37, o tratamento de células HEK293ABCG2 com as cromonas não alterou significativamente a expressão de ABCG2, confirmando os resultados obtidos anteriormente, onde a inibição deve ocorrer por uma provável ligação direta no sítio de inibição do transportador bloqueando o transporte de substratos.

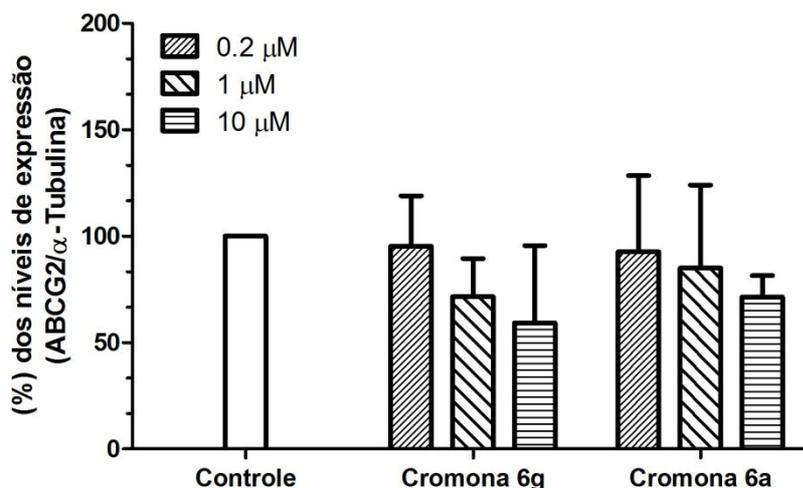


FIGURA 37 – EFEITO DAS CROMONAS SOBRE A EXPRESSÃO DE ABCG2  
 FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Efeito das cromonas **6g** e **6a** sobre os níveis de expressão de ABCG2. A análise da expressão de ABCG2 foi realizada por *western blot* como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.13. As células HEK293ABCG2 foram tratadas com as cromonas **6g** e **6a** nas concentrações de 0,2, 1 e 10 μM por 72 horas e o nível de expressão de ABCG2 (usando anticorpo monoclonal BXP-21) e α-tubulina (usando anticorpo monoclonal anti-α-tubulina) foi monitorado. Análise da densitometria das bandas foi realizada através do programa Quantity One 1-D.

#### 5.6.3.7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM AS CROMONAS

Os resultados obtidos para esta nova classe de inibidores específicos de ABCG2 fazem das cromonas excelentes candidatos para testes *in vivo*, uma vez que as cromonas identificadas aqui, foram no mínimo de 2 a 3 vezes mais eficientes que outros inibidores específicos de ABCG2, como por exemplo as flavonas (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005a), acridonas (BOUMENDJEL *et al.*, 2007b), boeravinonas (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2007) e outros tipos de inibidores provenientes de compostos naturais (NICOLLE *et al.*, 2009a; NICOLLE *et al.*, 2009b; PICK *et al.*, 2011). Os inibidores derivados do Tariquidar/XR9576 (PICK *et al.*, 2010), que foram modificados para se tornarem específicos para ABCG2 também são menos potentes que as cromonas identificadas em nosso trabalho.

Até o momento, o melhor inibidor de ABCG2 descrito na literatura é o Ko143, devido a sua alta afinidade pelo transportador. O Ko143 é um derivado do FTC que foi o primeiro inibidor seletivo de ABCG2 descrito na literatura, entretanto, mesmo o Ko143 sendo altamente potente para inibição de ABCG2 ele não é completamente seletivo, uma vez que inibe tanto a P-gp ( $IC_{50} = 1 \mu M$ ), quanto MRP1 ( $IC_{50} = 2 \mu M$ ) (ALLEN *et al.*, 2002). Vale a pena ressaltar que as cromonas identificadas neste trabalho, especialmente os compostos **2a** e **6a**, estimularam levemente o transporte de

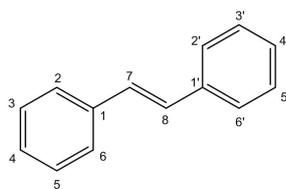
mitoxantrona pela P-gp (valores negativos apresentados na tabela 13), indicando que eles também reconhecem a P-gp, mas interagem de maneira diferente que em ABCG2. Estes resultados sugerem que o sítio de fixação de cromonas em P-gp não é o sítio de inibição ou ainda que as cromonas não são eficazes em promover as alterações conformacionais para inibição do transporte de mitoxantrona pela P-gp.

Outra vantagem apresentada pelas cromonas nesse trabalho é sua baixa citotoxicidade quando comparada a outros potentes inibidores de ABCG2, como as flavonas (qual apresentam um  $IG_{50}$  entre 9 a 16  $\mu M$ ) (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005a) e acridonas (qual apresentam uma redução de ~30% na viabilidade celular na faixa de 5 a 10  $\mu M$ ) (BOUMENDJEL *et al.*, 2011). As cromonas não foram transportadas por ABCG2, do mesmo modo que essas duas classes de compostos citados acima (flavonas e acridonas), constituindo uma vantagem em relação a inibidores de tirosina quinase (também descritos como potentes inibidores de ABCG2, como é o caso do Nilotinib), os quais são transportados por ABCG2 (BURGER *et al.*, 2004b). Baseados nestes dados, pode-se classificar as cromonas como inibidores “verdadeiros”, uma vez que ocupam apenas o sítio de inibição e não recobrem o sítio de transporte.

Em resumo, a cromona **6g** identificada nesse trabalho que apresentou uma ‘razão terapêutica’ ( $IG_{50}/IC_{50}$ ) maior que 2000, pode ser considerada como o melhor inibidor de ABCG2 já descrito *in vitro*, considerando o conjunto de fatores importantes para um inibidor como: (i) alta afinidade, (ii) completa inibição (100%), (iii) específico para ABCG2, (iv) não é transportado por ABCG2 e (v) baixa citotoxicidade. Estes 5 fatores fazem da cromona **6g** um promissor candidato para testes *in vivo* e posteriormente em testes pré-clínicos.

#### 5.6.4. EFEITOS DOS ESTILBENOS

Na busca de novas classes de inibidores do transporte de quimioterápicos por ABCG2 de maneira mais eficiente e seletiva, outra classe de compostos foi testada, os *trans*-estilbenos. Como apresentado na tabela 14, uma série de 11 derivados metoxilados dos estilbenos foram testados. Esses compostos variam tanto no número de grupos metoxi distribuídos em sua estrutura, quanto na posição dos grupamentos nos dois anéis aromáticos de sua estrutura básica.

TABELA 14 – ESTRUTURA DOS METOXI *trans*-ESTILBENOS

Estilbenos	Número de OMe	C2	C3	C4	C5	C3'	C4'	C5'
<b>1</b>	1 <i>ou</i>	-	- OMe <sup>a</sup>	-	-	-	OMe <sup>a</sup>	-
<b>2</b>	2	-	OMe	-	OMe	-	-	-
<b>3</b>	3	OMe	OMe	-	-	-	OMe	-
<b>4</b>	3	-	OMe	-	OMe	-	OMe	-
<b>5</b>	3	-	OMe	OMe	-	-	OMe	-
<b>6</b>	4	OMe	OMe	-	OMe	-	OMe	-
<b>7</b>	4	-	OMe	OMe	OMe	-	OMe	-
<b>8</b>	4	-	OMe	-	OMe	OMe	-	OMe
<b>9</b>	4	-	OMe	-	OMe	OMe	OMe	-
<b>10</b>	5	-	OMe	OMe	OMe	OMe	-	OMe
<b>11</b>	5	OMe	OMe	-	OMe	OMe	-	OMe

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Por razões de simetria, o estilbeno **1** pode apresentar as duas estruturas alternativas.

#### 5.6.4.1. EFEITOS DOS ESTILBENOS COMO INIBIDORES DE ABCG2, P-gp E MRP1

Como testado anteriormente com a hispidulina, chalconas e cromonas, os estilbenos foram testados em células HEK293ABCG2, quanto a sua capacidade de inibir o transporte de mitoxantrona por citometria de fluxo. Os resultados apresentados na tabela 15 mostram que a inibição do transporte de mitoxantrona por ABCG2 causada pelos estilbenos depende tanto do número de grupos metoxi (1 a 4), quanto da posição. O melhor inibidor identificado foi o estilbeno **9**, caracterizado por um baixo IC<sub>50</sub> (0,16 µM), um valor comparável ao obtido com o inibidor de referência testado aqui, o GF120918.

Com relação a estrutura-atividade pode-se observar que a presença do metoxi na posição 4' é importante para afinidade do composto por ABCG2, uma vez que ocorreu uma diminuição de aproximadamente 3 vezes no IC<sub>50</sub> quando o metoxi da posição 5' (estilbeno **8** = IC<sub>50</sub> de 0,47 µM) foi substituído para a posição 4' (estilbeno **9** = IC<sub>50</sub> de 0,16 µM) (tabela 15). Isso também pode explicar a menor eficiência do estilbeno **10** (IC<sub>50</sub> de 0,29 µM) *versus* estilbeno **9**, entretanto, foi observado que a presença de um metoxi na posição 4 desse composto é positiva, quando comparamos o estilbeno **10** *versus* estilbeno **8** (tabela 15). A presença do metoxi na posição 2 do estilbeno **11** (e estilbeno **6**) foi claramente negativa, quando comparado a substituição

na posição 4 do estilbeno **10** (e estilbeno **7**) (tabela 15). O efeito negativo na posição 2 também foi confirmado pela menor inibição observada com o estilbeno **3** comparado aos estilbenos **4** e **5**, e estilbeno **11** *versus* estilbeno **8**. Em adição a posição 4', a substituição na posição 3' é crucial para a inibição, uma vez que o estilbeno **4** foi menos ativo que o estilbeno **9** e esse efeito também foi observado comparando o estilbeno **7** *versus* estilbeno **10**. O efeito negativo do grupo metoxi na posição 4 *versus* posição 5 também foi observado quando comparamos a inibição a 5  $\mu\text{M}$  do estilbeno **5** *versus* estilbeno **4** (tabela 15).

TABELA 15 – INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE SUBSTRATOS PELOS ESTILBENOS EM CÉLULAS HEK293ABCG2, HEK293ABCB1 E HEK293ABCC1

Estilbenos	ABCG2 HEK293ABCG2			P-gp HEK293ABCB1	MRP1 HEK293ABCC1
	(% Inibição)		( $\mu\text{M}$ )	(% Inibição)	
	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	IC <sub>50</sub>	5 $\mu\text{M}$	
<b>GF120918</b>	nd	100,0	0,120 $\pm$ 0,03	100,0 (IC <sub>50</sub> =0,034 $\pm$ 0,01 $\mu\text{M}$ )	nd
<b>1</b>	-	5,1 $\pm$ 0,1	nd	-7,3 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,4
<b>2</b>	5,5 $\pm$ 2,7	9,9 $\pm$ 3,7	nd	-12,3 $\pm$ 0,5	-2,2 $\pm$ 0,5
<b>3</b>	-	6,6 $\pm$ 0,9	nd	-14,3 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 1,6
<b>4</b>	13,7 $\pm$ 5,4	36,2 $\pm$ 4,6	nd	-15,9 $\pm$ 1,0	-2,1 $\pm$ 0,1
<b>5</b>	11,9 $\pm$ 0,14	58,5 $\pm$ 21,6	nd	-19,2 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 7,2
<b>6</b>	8,8 $\pm$ 1,9	32,5 $\pm$ 12,2	nd	-23,5 $\pm$ 0,4	-2,4 $\pm$ 1,7
<b>7</b>	20,2 $\pm$ 4,9	55,7 $\pm$ 12,1	nd	-19,8 $\pm$ 1,5	4,6 $\pm$ 4,0
<b>8</b>	48,8 $\pm$ 3,6	67,4 $\pm$ 8,6	0,466 $\pm$ 0,08	-12,5 $\pm$ 12,6	3,2 $\pm$ 2,9
<b>9</b>	65,2 $\pm$ 7,2	75,6 $\pm$ 7,9	0,156 $\pm$ 0,04	-14,2 $\pm$ 13,6	2,7 $\pm$ 1,7
<b>10</b>	57,1 $\pm$ 9,7	76,7 $\pm$ 10,5	0,287 $\pm$ 0,09	-9,4 $\pm$ 11,0	1,1 $\pm$ 2,6
<b>11</b>	12,2 $\pm$ 3,3	34,2 $\pm$ 8,5	nd	-16,9 $\pm$ 2,3	2,3 $\pm$ 1,4

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Para as células HEK293ABCG2, o substrato utilizado foi a mitoxantrona (5  $\mu\text{M}$ ) e a porcentagem de inibição foi determinada em relação ao inibidor controle GF120918 (5  $\mu\text{M}$ ), qual inibe 100% do transporte. Os valores de (% de inibição) e IC<sub>50</sub> (metade da inibição máxima), foram determinados por citometria como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.17. Os dados representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes. Para as células HEK293ABCB1, as condições foram as mesmas que para células HEK293ABCG2. Para as células HEK293ABCC1, o substrato utilizado foi a calceína (0,2  $\mu\text{M}$ ) e a porcentagem de inibição foi determinada em relação as células transfetadas com o vetor vazio. Os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes.

A atividade inibitória do transporte por ABCG2 dos compostos metoxi-estilbenos foi completamente específica, uma vez que não foi observada nenhuma inibição do transporte de substratos tanto para P-gp quanto MRP1 usando 5  $\mu\text{M}$  destes compostos (tabela 15), ao contrário do observado com o GF120918, qual inibe P-gp com uma maior afinidade (tabela 15).

A atividade inibitória dos estilbenos para o transporte por P-gp também foi estudada usando outro substrato da P-gp, a rodamina 123. Como apresentado na figura 38A, os estilbenos foram capazes de inibir o transporte de rodamina 123 por P-

gp apenas em altas concentrações (100  $\mu\text{M}$ ), entretanto, mesmo nessa concentração a inibição foi parcial, chegando a ~25% para o estilbeno **9** e ~10% para o estilbeno **10**.

A rodamina 123 não é transportada por ABCG2, entretanto o mutante R482T de ABCG2 é capaz de transportar rodamina 123 entre outros substratos que não são transportados por ABCG2 selvagem (BOUMENDJEL *et al.*, 2011). Para comparar o efeito desses novos inibidores de ABCG2 sobre o transporte de rodamina 123, foi utilizado o mutante R482T de ABCG2. Pode-se observar na figura 38B, que o estilbeno **9** apresentou uma inibição máxima de ~75% (como para mitoxantrona em ABCG2 selvagem), porém com um  $\text{IC}_{50}$  de 0,45  $\mu\text{M}$ . Surpreendentemente, a inibição provocada pelo GF120918 sobre o transporte de rodamina 123 no mutante de ABCG2 (R482T) não foi completa e com uma afinidade menor que a observada com o estilbeno **9** ( $\text{IC}_{50}$  de 2,7  $\mu\text{M}$ ) (figura 38B). Esses resultados utilizando o substrato rodamina 123 foram diferentes dos obtidos com a mitoxantrona, sugerindo que o mecanismo de inibição do GF120918 e dos estilbenos pode ser diferente.

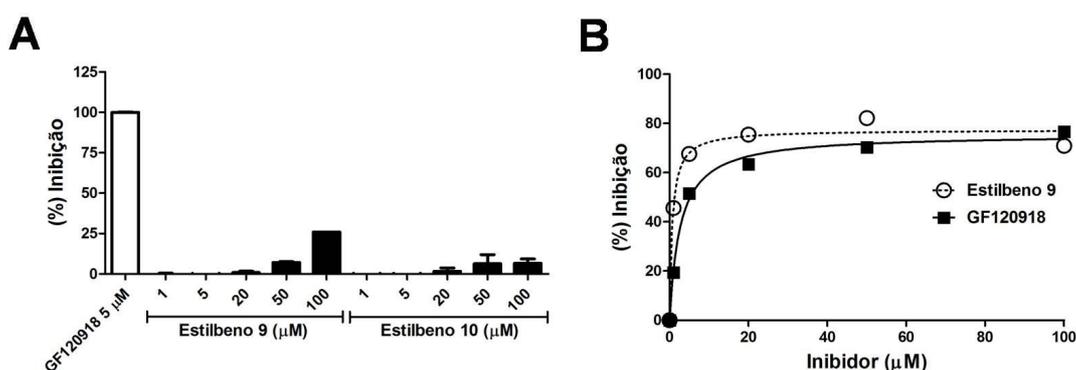


FIGURA 38 – EFEITO DOS ESTILBENOS SOBRE O TRANSPORTE DE RODAMINA EM P-gp E O MUTANTE R482T DE ABCG2

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: (A) Efeitos dos estilbenos **9** e **10** sobre o transporte de rodamina 123 em células HEK293ABCB1. A porcentagem de inibição foi determinada por citometria de fluxo como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.17 e o GF120918 (5  $\mu\text{M}$ ) como um controle de 100% de inibição. Os dados representam a média  $\pm$  DP de dois experimentos independentes. (B) Efeito do estilbeno **9** e o GF120918 sobre o transporte de rodamina no mutante R482T de ABCG2. A porcentagem de inibição foi determinada por citometria de fluxo e os resultados normalizados com células HEK293 transfectadas com o vetor vazio.

#### 5.6.4.2. CITOTOXICIDADE DOS ESTILBENOS

A próxima etapa do trabalho foi avaliar a citotoxicidade dos dois melhores estilbenos identificados como potentes inibidores de ABCG2, para isso foi realizado um ensaio de viabilidade celular em células HEK293ABCG2 e células HEK293 transfectadas com o vetor vazio após exposição destes compostos por 72 horas de tratamento. Como pode-se observar na figura 39, os estilbenos **9** e **10** (10  $\mu\text{M}$ ) apresentaram uma redução na viabilidade celular de aproximadamente 10% e 20%,

respectivamente. Para ambos os estilbenos o  $IG_{50}$  foi maior que  $60 \mu\text{M}$ , caracterizando uma baixa citotoxicidade, com uma razão  $IG_{50}/IC_{50}$  de 200 a 400 (indicado na figura 39 e tabela 15). Pode-se observar nas figuras 39A e 39B a falta de *cross-resistance*, sugerindo que estes compostos não são transportados por ABCG2.

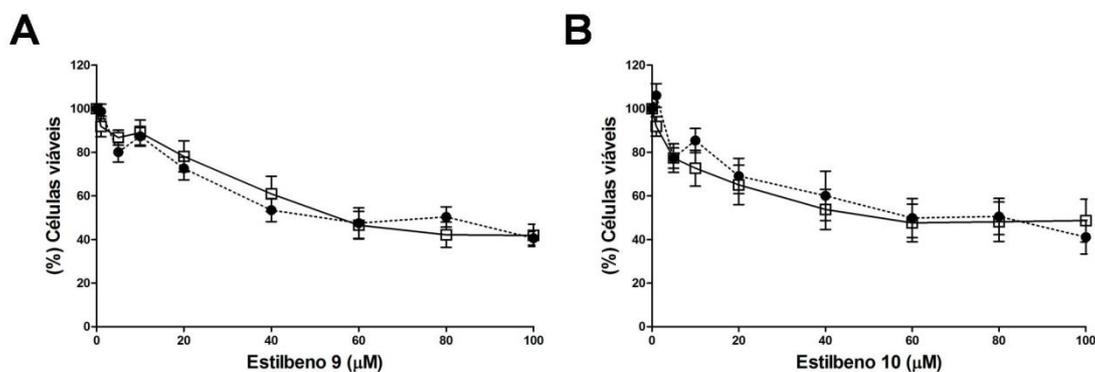


FIGURA 39 – CITOTOXICIDADE DOS ESTILBENOS

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Viabilidade celular em células HEK293ABCG2 (□) e HEK293 transfectadas com o vetor vazio (●) após 72 horas de tratamento com os estilbenos identificados nas figuras foi realizado de acordo com a seção de Materiais e Métodos item 4.4.2. Os valores representam a média  $\pm$  DP da porcentagem de células viáveis em relação ao controle tratado apenas com DMSO. Os dados correspondem ao menos dois experimentos realizados em triplicata.

#### 5.6.4.3. QUANTIDADE INTRACELULAR DOS ESTILBENOS EM CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM ABCG2

Os resultados de viabilidade celular sugerem que os estilbenos não são transportados por ABCG2, entretanto, para confirmar esses dados foi realizado um ensaio para quantificar a concentração intracelular dos estilbenos **9** e **10** em células HEK293ABCG2 e comparar com a quantidade intracelular em células transfectadas com o vetor vazio. Em paralelo foi realizado um controle com mitoxantrona (substrato) e GF120918 (inibidor de referência). Como apresentado na figura 40, a quantidade intracelular de mitoxantrona em células superexpressando ABCG2 diminuiu  $\sim 80\%$ , sendo que na presença de GF120918 os níveis de mitoxantrona intracelulares retornaram a valores próximos aos observados em células transfectadas com o vetor vazio (figura 40). Tanto GF120918 quanto os estilbenos não foram transportados por ABCG2 (figura 40), confirmando os resultados da falta de *cross-resistance* obtidos no ensaio de viabilidade celular.

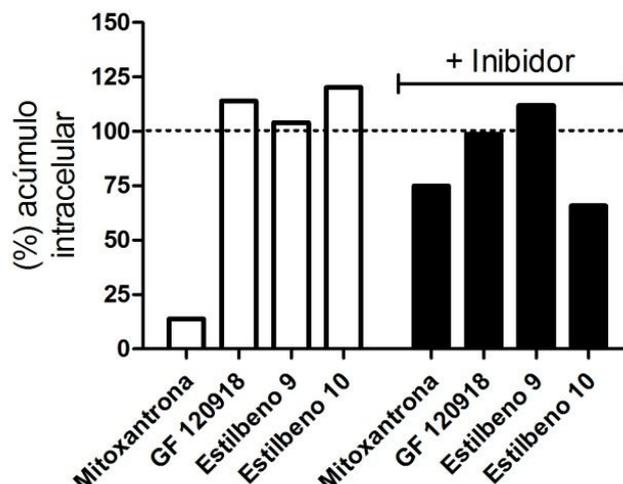


FIGURA 40 – TRANSPORTE DOS ESTILBENOS POR ABCG2

FONTES: O Autor (2012)

NOTA: Os estilbenos **9** e **10** foram incubados na concentração de 2  $\mu\text{M}$  e a quantidade intracelular foi determinada por HPLC-MS/MS como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.19. Os resultados em porcentagem foram normalizados usando as células transfectadas com o vetor vazio como controle (100%). No caso de transporte, foi realizado um controle usando um inibidor de referência (GF120918 – 5  $\mu\text{M}$ ), para os estilbenos, ou (Ko143 - 0,3  $\mu\text{M}$ ), no caso do GF120918. A quantidade de cada composto em células HEK293ABCG2 foi: Mitoxantrona (107 ng/mg.prot.), GF120918 (101 ng/mg.prot.), **9** (1,94 ng/mg.prot.) and **10** (2,2 ng/mg.prot.).

#### 5.6.4.4. AÇÃO DOS ESTILBENOS NA SENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM ABCG2

Para saber se após longos períodos de exposição com os estilbenos poderia se observar um efeito inibitório de ABCG2 capaz de reverter o fenótipo de resistência, as células HEK293ABCG2 foram tratadas com mitoxantrona por 72 horas na presença ou ausência dos estilbenos e ainda comparados com o tratamento das células controles (transfectadas com o vetor vazio). Como observado nas figuras 41A e 41B, ambos os estilbenos, **9** e **10**, reverteram parcialmente o fenótipo de resistência ao tratamento com mitoxantrona. Estes resultados também sugerem que esses compostos não sofreram modificações após 72 horas, pois mesmo na concentração de 0,2  $\mu\text{M}$  (valor próximo do  $\text{IC}_{50}$ ), foi observado um efeito de reversão da sensibilidade ao tratamento com o quimioterápico (figura 41A e 41B).

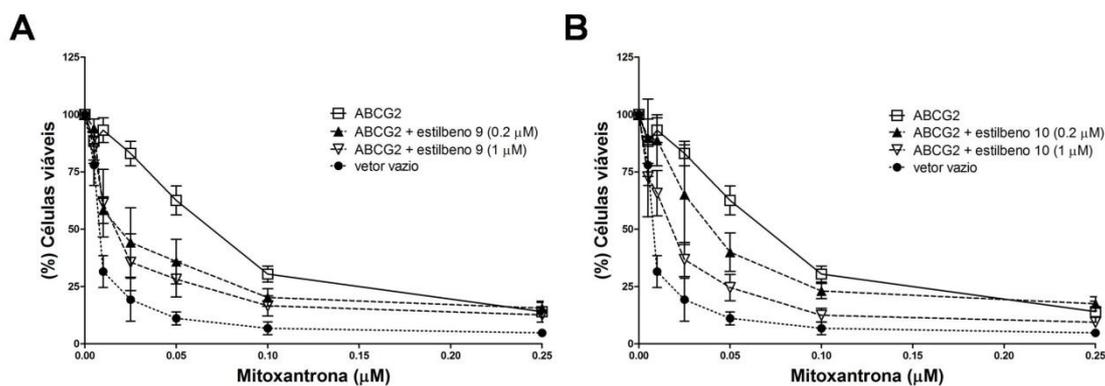


FIGURA 41 – AÇÃO DOS ESTILBENOS NA SENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM ABCG2

FUNTE: O Autor (2012)

NOTA: Sensibilização da citotoxicidade da mitoxantrona em células superexpressando ABCG2. A viabilidade celular em células HEK293 transfetadas como o vetor vazio e em células HEK293ABCG2 na presença de mitoxantrona foi realizada após 72 horas de tratamento pelo método do MTT como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.4.2. Nas mesmas condições, as células HEK293ABCG2 foram co-tratadas com os estilbenos 9 e 10. Os valores representam a média  $\pm$  DP da porcentagem das células viáveis em relação ao controle e os dados correspondem a três experimentos independentes.

#### 5.6.4.5. TIPO DE INIBIÇÃO PROVOCADA PELOS ESTILBENOS

Dois motivos sugerem que o mecanismo de inibição apresentado pelos estilbenos é diferente do observado com o inibidor de referência GF120918: (i) os estilbenos apresentaram uma inibição máxima de 75% no transporte de mitoxantrona por ABCG2, diferentemente dos 100% de inibição observado com o GF120918, (ii) os estilbenos e o GF120918 apresentaram efeitos diferentes sobre a inibição do transporte de mitoxantrona *versus* rodamina 123. Para melhor entender o mecanismo de inibição promovida por estes compostos foram testadas diferentes concentrações de inibidor e mitoxantrona para plotar um gráfico de duplo-recíproco (Lineweaver-Burk). Contudo, nesse modelo de gráfico não foi observado uma linearidade (dados não mostrados), impossibilitando esse tipo de apresentação, por isso os dados foram normalizados para apresentações em retas. Para obter estes valores normalizados, os dados obtidos em unidades arbitrárias de fluorescência na presença de cada concentração de inibidor foram divididos pelo valor obtido na ausência dos mesmos, gerando retas, as quais podem significar inibição não-competitiva (retas paralelas), competitivas (inclinadas para cima) e incompetitivas (inclinadas para baixo). Uma provável explicação dessa curvatura nas representações de duplo-recíproco é a presença de cooperatividade negativa, a qual será apresentada com maiores detalhes a seguir.

Foram separadas duas faixas de concentração de substrato (mitoxantrona), (i) baixa concentração – 0,25 a 2  $\mu$ M e (ii) alta concentração – 2,5 a 10  $\mu$ M. Na figura 42

pode-se observar que tanto o estilbeno **9** quanto o **10** apresentaram uma inibição não-competitiva, uma vez que o grau de inibição depende apenas da concentração dos estilbenos e não do substrato mitoxantrona, tanto em baixa quanto em alta concentração. Em contraste, o GF120918 apresentou inibição parcialmente competitiva na faixa de baixas concentrações de mitoxantrona, onde uma maior inibição foi observada com menores concentrações do substrato (figura 42). Entretanto, em altas concentrações de mitoxantrona a inibição foi não-competitiva, como observado pelos estilbenos (figura 42).

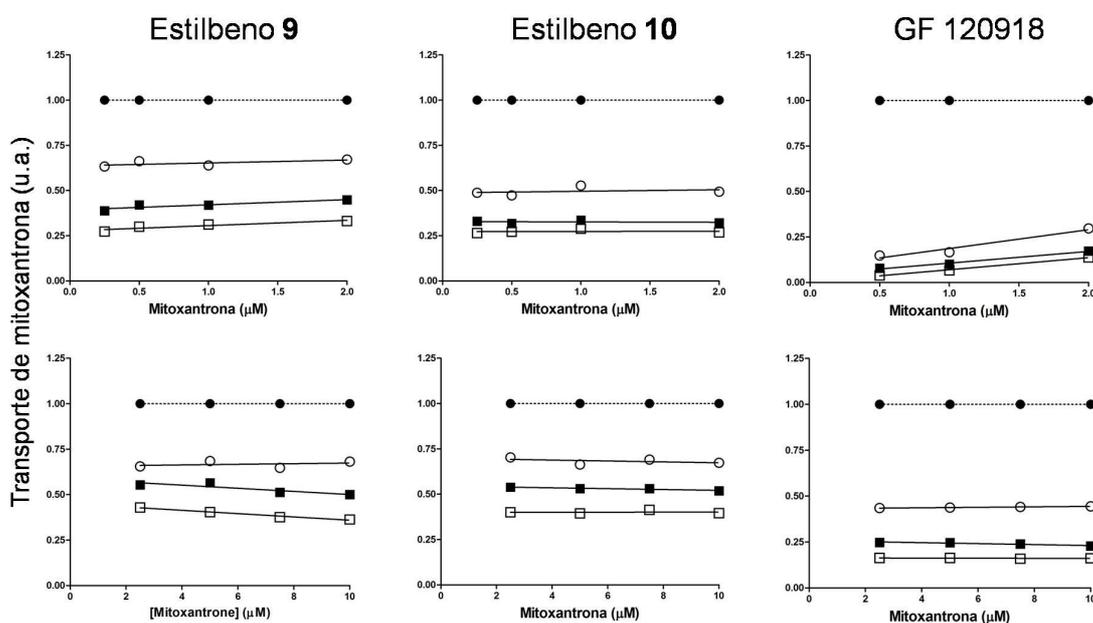


FIGURA 42 – TIPO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE MITOXANTRONA  
 FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Tipo de inibição provocado pelos estilbenos **9**, **10** e GF120918 (●) 0  $\mu\text{M}$ , (O) 0.1  $\mu\text{M}$ , (■) 0.5  $\mu\text{M}$  and (□) 2  $\mu\text{M}$  no transporte de mitoxantrona em células HEK293ABC2. O transporte de mitoxantrona foi monitorado por citometria de fluxo como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.17. Na parte superior da figura temos os resultados utilizando baixas concentrações de mitoxantrona (0,25 a 2  $\mu\text{M}$ ) e na parte inferior utilizando altas baixas concentrações de mitoxantrona (2 a 10  $\mu\text{M}$ ).

#### 5.6.4.6. EFEITO DOS ESTILBENOS SOBRE A ATIVIDADE ATPase DE ABCG2

Para continuar explorando o mecanismo de ação do GF120918 *versus* estilbenos, foi avaliado o efeito dos compostos sobre a atividade ATPase sensível ao vanadato, usando membranas de células HEK293ABC2. O vanadato é um inibidor da atividade ATPase dos transportadores ABC, por isso ele é utilizado para encontrar a atividade específica do transportador. Foi observado um efeito diferencial entre GF120918 e os estilbenos, onde a exposição com GF120918 (5  $\mu\text{M}$ ) não alterou a

atividade ATPase, enquanto que ambos os estilbenos estimularam essa atividade em 2 vezes no caso do estilbeno **9** e 1,5 vezes no caso do estilbeno **10** (figura 43).

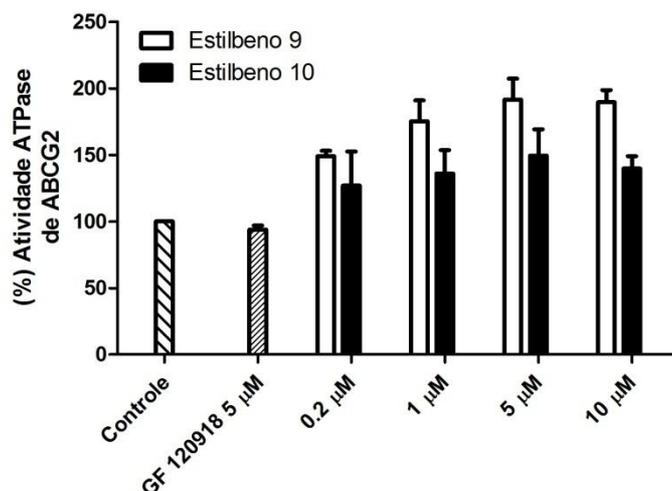


FIGURA 43 – EFEITO DOS ESTILBENOS SOBRE A ATIVIDADE ATPase DE ABCG2

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Efeito dos compostos sobre a atividade ATPase de ABCG2 sensível ao vanadato, usando membranas de células HEK293ABCG2. A atividade ATPase foi realizado como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.18 e os resultados normalizados ao controle. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Devido à possibilidade dos inibidores de ABCG2 (como estilbenos *versus* GF120918) apresentarem diferentes sítos de fixação no transportador, a próxima etapa foi avaliar a possibilidade de usar os estilbenos com outros inibidores para tentar bloquear 100% do transporte de mitoxantrona.

#### 5.6.4.7. BI-MODULAÇÃO USANDO ESTILBENOS SOBRE A INIBIÇÃO DE ABCG2

Para realizar este ensaio de bi-modulação (uso de dois inibidores ao mesmo tempo), foram selecionados inibidores de ABCG2 de diferentes classes. Foram utilizados inibidores específicos de ABCG2, como o FTC e seu derivado, o Ko143, os quais inibem 100% do transporte de substratos por ABCG2 (BOUMENDJEL *et al.*, 2011) e a 6-prenilcrisina, que apresenta uma alta afinidade por ABCG2, porém promove uma inibição parcial do transporte de substratos (~70%) (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005b). Também foram utilizados inibidores não seletivos de ABCG2, como é o caso do GF120918, nilotinib e prazosina (BOUMENDJEL *et al.*, 2011).

Como apresentado na figura 44, o uso de diferentes inibidores de ABCG2 em combinação com o estilbeno **9** promoveram efeitos diferentes. Foi observado que o estilbeno **9** (2 µM) inibe 75% do transporte. Quando utilizado em combinação com o

estilbeno **10** (0,4  $\mu\text{M}$ ) ou 6-prenilcrisina (2  $\mu\text{M}$ ), não foi observado efeito aditivo na inibição, sugerindo que estes compostos ocupam o mesmo sítio ativo (figura 44). Em contraste, a combinação do estilbeno **9** com concentrações próximas do  $\text{IC}_{50}$  dos compostos GF120918, nilotinib e prazosina produziram uma inibição completa do transporte de mitoxantrona por ABCG2 (figura 44). Efeitos intermediários foram observados com o FTC e ainda nenhuma diferença foi observada na presença do Ko143 (figura 44). Esses resultados de bi-modulação, através do uso de dois inibidores para chegar a 100% de inibição, comprovam a presença de diferentes sítos de fixação de inibidores em ABCG2.

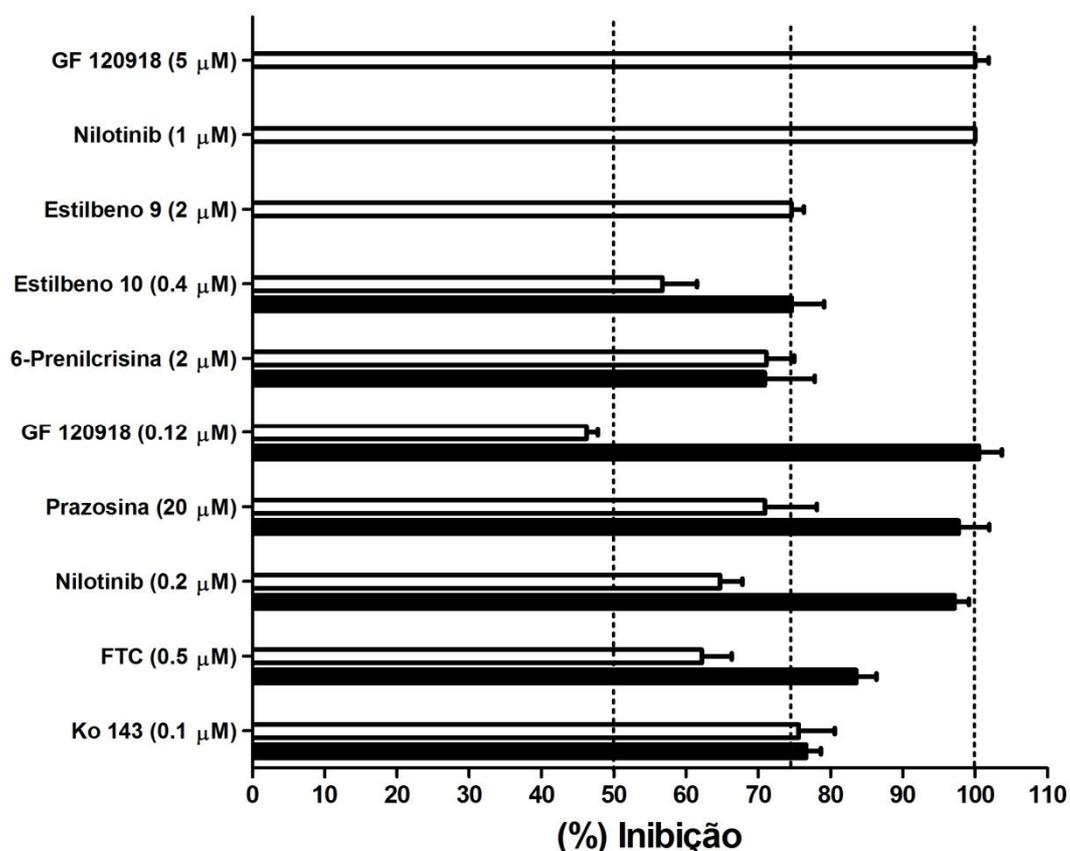


FIGURA 44 – BI-MODULAÇÃO DOS ESTILBENOS EM SOBRE A INIBIÇÃO DE ABCG2  
 FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Ensaio de bi-modulação foram realizados por citometria de fluxo usando mitoxantrona como substrato como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.17. Os compostos foram usados sozinhos (barras brancas), nas concentrações indicadas, ou em combinação com 2  $\mu\text{M}$  do estilbeno **9** (barras escuras). Os dados representam a média  $\pm$  DP de quatro experimentos independentes.

#### 5.6.4.7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM OS ESTILBENOS

Acredita-se que o sítio de transporte de ABCG2 apresenta uma grande similaridade com o sítio de transporte da P-gp, devido ao transporte de substratos

comuns, como mitoxantrona, Hoechst 33342, prazosina entre outros. A especificidade dos estilbenos para inibir ABCG2 é consistente com a inibição não-competitiva, a qual indica que estes compostos se fixam em um sítio distinto do sítio de transporte.

Pode-se sugerir que os metoxi-estilbenos identificados neste trabalho ocupam o mesmo sítio que a 6-prenilcrisina, uma flavona que também apresenta um efeito máximo de 75% de inibição de ABCG2 (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005a). Além de não bloquearem 100% do transporte, quando utilizados em conjunto (estilbeno **9** + 6-prenilcrisina), não foi observado efeito aditivo, apoiando esta hipótese. Apesar de não bloquearem completamente o transporte de mitoxantrona em ABCG2, os estilbenos são compostos promissores, pois podem ser empregados de duas maneiras: (i) sozinhos, caso 75% de inibição seja suficiente para reversão do fenótipo de resistência, com a vantagem de não bloquear completamente a atividade de um transportador com importantes funções fisiológicas, ou (ii) combinados com outros inibidores de ABCG2, como o GF120918, nilotinib ou prazosina, os quais poderiam ser utilizados em baixas concentrações, para então bloquear 100% do transporte de substratos. Os estilbenos **9** e **10**, se comparados às flavonas (6-prenilcrisina e tectocrisina), apresentam uma maior afinidade por ABCG2 com uma razão  $IG_{50}/IC_{50}$  10 vezes maior (200 a 400 *versus* 20 a 40).

A estratégia de estudar estilbenos foi baseada na tentativa de transformar um substrato de ABCG2, o resveratrol (um trihidroxi-estilbeno) (BREEDVELD *et al.*, 2007), em um inibidor de ABCG2, através da substituição de grupos hidroxí por grupos metoxi. Como apresentado na figura 45, a estratégia funcionou e obteve-se um potente inibidor de ABCG2 (estilbeno **9**), a partir do resveratrol. Esses resultados confirmam observações anteriores, onde no caso de flavonas, a metoxilação aumentou a eficiência na inibição de ABCG2 (tectocrisina *versus* crisina) (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2005a). Em resumo, os estilbenos juntamente com as chalconas e cromonas aparecem como excelentes candidatos para posteriores ensaios *in vivo*.

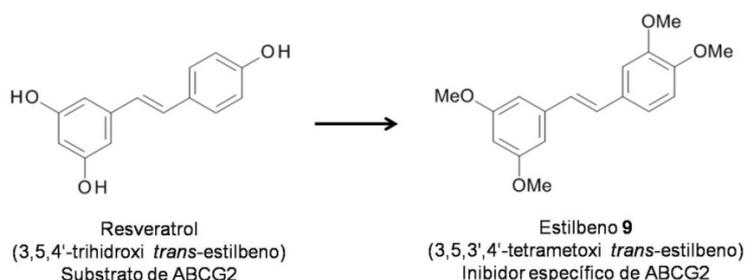


FIGURA 45 – ESTRATÉGIA USADA PARA TRANSFORMAR UM SUBSTRATO EM INIBIDOR  
FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Estrutura do resveratrol, um hidroxi *trans*-estilbeno (qual é transportado por ABCG2) e um metoxi *trans*-estilbeno (compôs **9**, identificado como potente inibidor de ABCG2).

### 5.6.5. MECANISMO DE INIBIÇÃO DE ABCG2

Muitas classes de compostos têm sido identificadas como inibidores ou substratos de ABCG2, entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de inibição e transporte deste transportador, apesar de apresentar similaridades com outros transportadores melhor estudados, como é o caso da P-gp. Neste trabalho foram identificados três novas classes de inibidores de ABCG2, chalconas, cromonas e estilbenos, sendo que cada uma destas classes apresentou particularidades: (i) chalconas: foram identificados compostos que bloqueiam parcialmente ou completamente o transporte de substratos; (ii) cromonas: inibidores que bloqueiam completamente o transporte e (iii) estilbenos: inibidores parciais, bloqueando ~75% do transporte. Outra característica identificada é que para alguns inibidores (ex: estilbenos *versus* GF120918) o sítio de fixação em ABCG2 é provavelmente diferente, sugerindo diferentes sítios de inibição neste transportador. Na tentativa de melhor entender o mecanismo de transporte e inibição de ABCG2, alguns ensaios com diferentes inibidores e substratos foram realizados.

#### 5.6.5.1. NÚMERO DE HILL DOS DIFERENTES SUBSTRATOS DE ABCG2

Baseados nos dados apresentados anteriormente sobre o tipo de inibição dos estilbenos foi observada uma possível cooperatividade negativa no transporte de mitoxantrona em ABCG2. Para avaliar essa hipótese, foram selecionados 4 substratos fluorescentes de ABCG2 (mitoxantrona, hoechst 33342, feoforbídeo a e BODIPY FL prazosina) e o transporte de cada um destes substratos foi monitorado por citometria de fluxo. Como observado na figura 46A, a mitoxantrona apresentou um número de Hill inferior a 1, que indica uma cooperatividade negativa. Entretanto, todos os outros substratos testados apresentaram uma cooperatividade positiva (hoechst 33342 < feoforbídeo a < BODIPY FL Prazosina), figuras (46C, 46D e 46E). Para confirmar os resultados obtidos com a mitoxantrona, foi avaliado o número de Hill para o transporte de mitoxantrona no mutante R482T de ABCG2 (figura 46B), que confirmou a cooperatividade negativa observada em ABCG2 selvagem. Porém, observa-se que a cooperatividade negativa apresentada pelo mutante R482T (número de Hill de 0,87, figura 46B) foi menos pronunciada que em ABCG2 selvagem (número de Hill de 0,78, figura 46A). Esses resultados sugerem a presença de no mínimo dois sítios de interação de cada substrato em um oligômero funcional de ABCG2.

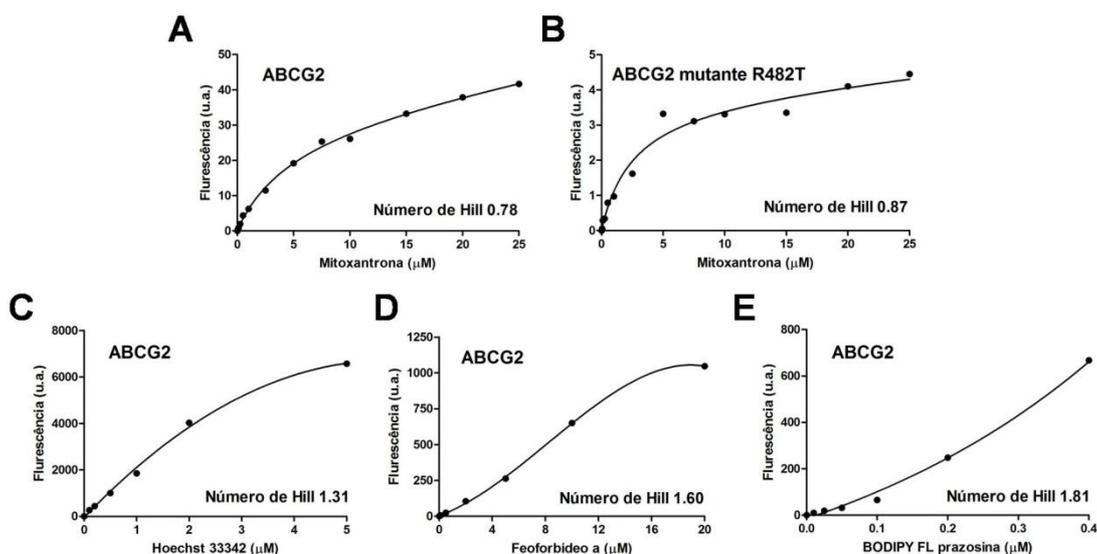


FIGURA 46 – NÚMERO DE HILL DOS DIFERENTES SUBSTRATOS DE ABCG2

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: As curvas foram obtidas medindo a fluorescência ( $\Delta G_{Mean}$ ) de cada substrato por citometria de fluxo. No caso do transporte do Hoechst 33342, foi utilizado o filtro UV de um citômetro LSR II (BD). Para todos os outros substratos, foi utilizado um FACS Calibur com 4 canais. Para BODIPY FL prazosina, foi utilizado o filtro FL1, já para mitoxantrona e feoforbídeo a, foi utilizado o filtro FL4. O número de Hill para todos os substratos foi realizado utilizando células HEK293ABCG2, exceto para a mitoxantrona, que além desse modelo celular, também foi utilizado o mutante de ABCG2, o R482T. As curvas foram obtidas através da equação  $f = a \cdot x^b / (c^b + x^b)$ , onde, 'b' é o número de Hill.

#### 5.6.5.2. COMPETIÇÃO DE SUBSTRATOS *versus* SUBSTRATOS

No caso da P-gp, é proposto a existência de no mínimo 3 sítios de transporte diferentes, um sítio R (de Rodamina), um sítio H (de Hoechst) e um terceiro sítio P (de Progesterona) (SHAPIRO e LING, 1997). Ainda existem dúvidas a respeito desta divisão entre os sítios, mas o que se sabe é que alguns substratos bloqueiam o transporte de outros por provavelmente ocupar o mesmo sítio, enquanto outros substratos não interferem no transporte.

Para melhor entender se isso também ocorre em ABCG2, foram selecionados 6 substratos clássicos de ABCG2 (mitoxantrona, feoforbídeo a, prazosina, hoechst 33342, quercetina e SN-38), dois substratos que são transportados pelo mutante R482T mas não por ABCG2 selvagem, entretanto se fixam no mesmo (doxorubina e rodamina 123) e um derivado fluorescente do metotrexato (metotrexato fluoresceína). O transporte de mitoxantrona, Hoechst 33342, feoforbídeo a e BODIPY FL prazosina foi monitorado por citometria na presença de cada um dos compostos listados a cima.

Apesar do feoforbídeo a (10  $\mu M$ ) inibir 15% o transporte de Hoechst 33342 e a quercetina (50  $\mu M$ ) inibir 20% o transporte de BODIPY FL Prazosina, de todos os substratos avaliados, apenas a prazosina foi capaz de inibir o transporte de mitoxantrona, Hoechst 33342, feoforbídeo a e BODIPY FL prazosina (tabela 16).

Esses resultados sugerem que existem diferentes sítios de transporte de substratos dentro de um grande sítio de transporte, ou dentro de um grande 'bolso' de transporte e que diferentes substratos podem ser transportados ao mesmo tempo sem competição entre eles, uma vez que um substrato não inibe o transporte do outro (tabela 16).

TABELA 16 – COMPETIÇÃO DE SUBSTRATOS *versus* SUBSTRATOS EM CÉLULAS HEK293ABC2

	Mitoxantrona (10 $\mu$ M)	Feoforbídeo a (10 $\mu$ M)	BODIPY FL prazosina (0.2 $\mu$ M)	Hoechst 33342 (2 $\mu$ M)
<b>Mitoxantrona (10 <math>\mu</math>M)</b>	-	X	X	não
<b>Feoforbídeo a (10 <math>\mu</math>M)</b>	X	-	X	15%
<b>Prazosina (20 <math>\mu</math>M)</b>	50%	30%	50%	50%
<b>Hoechst 33342 (2 <math>\mu</math>M)</b>	não	não	não	-
<b>Quercetina (50 <math>\mu</math>M)</b>	não	não	20%	não
<b>Metotrexato Fluoresceína (20 <math>\mu</math>M)</b>	não	não	X	não
<b>Doxorubicina (10 <math>\mu</math>M)</b>	não	não	não	não
<b>Rodamina 123 (10 <math>\mu</math>M)</b>	não	não	não	não
<b>SN-38 (10 <math>\mu</math>M)</b>	não	não	não	não

FONTE: O autor (2012)

NOTA: O transporte de cada substrato (mitoxantrona, feoforbídeo a, BODIPY FL prazosina e Hoechst 33342) foi monitorado por citometria de fluxo. A porcentagem de inibição do transporte de cada substrato em células HEK293ABC2, na presença dos compostos listados na primeira coluna da tabela, foi determinada em relação as células transfectadas com o vetor vazio. (não = sem inibição e X = impossibilidade de determinação por utilizar o mesmo filtro).

### 5.6.5.3. INIBIÇÃO DE DIFERENTES INIBIDORES *versus* DIFERENTES SUBSTRATOS

Foi observado que diferentes inibidores de ABCG2 podem se comportar de maneira diferente. Para melhor compreender o mecanismo de inibição de ABCG2 foram selecionados 4 diferentes inibidores: (i) GF120918, um inibidor não específico e com maior afinidade por P-gp, (ii) Ko143, um inibidor não específico mas com maior

afinidade por ABCG2, (iii) cromona **6a**, um inibidor completamente específico de ABCG2 e (iv) estilbeno **9**, um inibidor específico de ABCG2, porém promove uma inibição parcial. Esses 4 inibidores foram testados quanto a sua capacidade de inibir o transporte dos 4 substratos utilizados no experimento anterior.

Foram determinados os valores de inibição máxima (concentração saturante) e os valores de IC<sub>50</sub> de cada um dos 4 diferentes inibidores de ABCG2 frente aos 4 substratos selecionados. Como pode-se observar nos resultados apresentados na tabela 17, os valores de IC<sub>50</sub> variam entre diferentes substratos, como no caso da cromona **6a**, que apresentou uma variação de IC<sub>50</sub> de aproximadamente 4 vezes, comparando mitoxantrona *versus* feoforbídeo a. Embora os diferentes inibidores tenham apresentado variação nas intensidades de inibição, todos os inibidores avaliados foram capazes de inibir o transporte dos 4 substratos (mitoxantrona, hoechst 33342, feoforbídeo a e BODIPY FL prazosina) (tabela 17), sugerindo que um inibidor de ABCG2 pode ser capaz de inibir uma grande gama, ou ainda todos os substratos de ABCG2.

TABELA 17 – INIBIÇÃO DE DIFERENTES INIBIDORES *versus* DIFERENTES SUBSTRATOS

	Ko 143		GF 120918		Cromona 6a		Estilbeno 9	
	Max. inib. (%)	IC <sub>50</sub> (µM)						
<b>Mitoxantrona (5 µM)</b>	100	0,050	100	0,21	100	0,82	75	0,16
<b>Feoforbídeo a (2 µM)</b>	100	0,050	100	0,42	70	0,12	50	0,56
<b>BODIPY FL prazosina (0.2 µM)</b>	100	0,042	100	0,12	100	0,20	75	0,22
<b>Hoechst 33342 (2 µM)</b>	100	0,028	100	0,12	100	0,26	70	0,50

FONTE: O autor (2012)

NOTA: O transporte de cada substrato (mitoxantrona, feoforbídeo a, BODIPY FL prazosina e Hoechst 33342) foi monitorado por citometria de fluxo na presença dos inibidores (Ko 143, GF120918, cromona **6a** e estilbeno **9**). A porcentagem de inibição do transporte de cada substrato em células HEK293ABCG2, na presença dos compostos, foi determinada em relação as células transfectadas com o vetor vazio.

#### 5.6.5.4. TIPO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE MITOXANTRONA

Anteriormente foi mostrado que os estilbenos e o GF120918 (em altas concentrações de mitoxantrona) promovem uma inibição não-competitiva. Para avaliar se este tipo de inibição também ocorre com outros inibidores de ABCG2 foram

avaliados a cromona **6a**, o Ko143 e a prazosina, a qual é um substrato de ABCG2 que promove uma inibição parcial no transporte de diferentes substratos. Os resultados apresentados na figura 47 apoiam os dados obtidos com os estilbenos e GF120918, onde todos os compostos apresentam uma inibição não-competitiva. Esse tipo de inibição não-competitiva promovida por inibidores de ABCG2 explica porque um inibidor é capaz de bloquear o transporte de diferentes substratos, uma vez que estes inibidores provavelmente não ocupam o sítio de transporte, sugerindo que os inibidores se fixam em ABCG2 e alteram a conformação do transportador, assim, bloqueando o transporte de substratos.

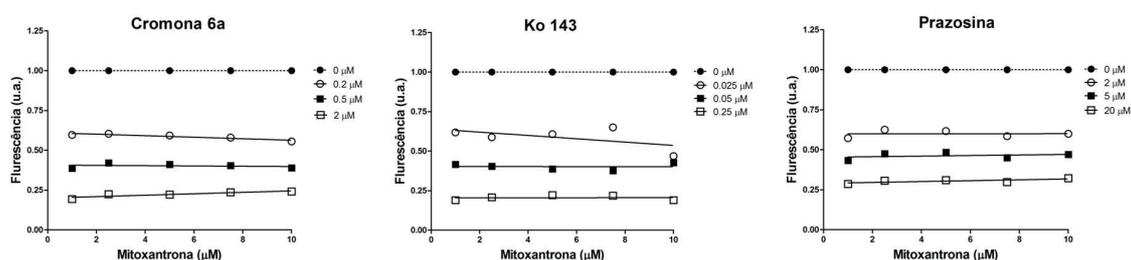


FIGURA 47 – TIPO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE MITOXANTRONA  
 FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Tipo de inibição provocado pelos compostos cromona **6a**, Ko 143 e prazosina, no transporte de mitoxantrona em células HEK293ABCG2. O transporte de mitoxantrona foi monitorado por citometria de fluxo como descrito na seção de materiais e métodos.

#### 5.6.5.5. EFEITOS DO VANADATO, INIBIDORES E SUBSTRATOS SOBRE A INTERAÇÃO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 5D3 À ABCG2

Os resultados obtidos neste trabalho envolvendo o mecanismo de inibição de ABCG2 sugerem que os inibidores se fixam em um sítio diferente do sítio de transporte e provocam mudanças conformacionais impedindo o transporte do substrato, podendo ocorrer de maneira parcial ou completa. Para investigar essa hipótese, foram realizados ensaios utilizando um anticorpo conformacional chamado 5D3. O anticorpo 5D3 reconhece um epítipo extracelular localizado em uma volta de ABCG2, localizada entre os domínios transmembrana 5 e 6.

As células HEK293ABCG2 foram expostas por 30 minutos à diferentes substratos de ABCG2, os quais não emitem fluorescência na mesma faixa que a ficoeritrina (fluoróforo acoplado ao 5D3). Após incubação dos substratos (SN-38, hoechst 33342, topotecan e quercetina) em concentrações saturantes, as células foram expostas ao anticorpo. Como apresentado na figura 48, aparentemente os substratos não alteraram, ou muito pouco, a fluorescência emitida, sugerindo que os

substratos não alteram a estrutura de ABCG2 ao nível de reconhecimento do epitopo do 5D3.

Para avaliar como os inibidores de ABCG2 se comportam, foram avaliados a capacidade dos mesmos 4 inibidores (GF120918, Ko143, cromona **6a** e estilbeno **9**) em modificar a interação do anticorpo 5D3 ao transportador ABCG2. Todos inibidores capazes de bloquear 100% do transporte de substratos por ABCG2 também promoveram um aumento na fluorescência emitida pelo 5D3, confirmando que inibidores provocam alterações conformacionais em ABCG2 levando ao bloqueio do transporte de substratos (figura 48). Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos pela equipe do Dr. Sarkadi (laboratório que caracterizou o uso do anticorpo 5D3), onde foi observado que alguns inibidores de ABCG2 aumentam a intensidade de fluorescência emitida pelo 5D3 (TELBISZ *et al.*, 2012). Outro resultado interessante foi que o estilbeno **9** não alterou a fluorescência do 5D3, sugerindo que esse inibidor se fixa em um sítio diferente dos outros inibidores, não alterando a acessibilidade do anticorpo 5D3 por promover efeitos conformacionais diferentes dos outros inibidores (figura 48).

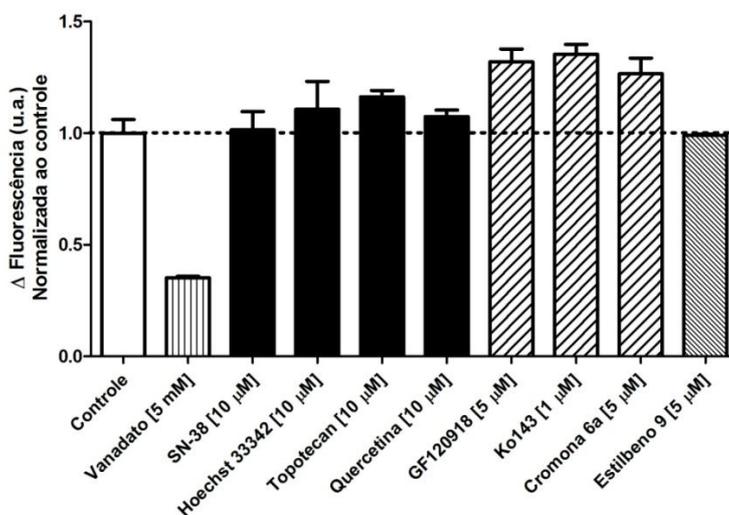


FIGURA 48 – EFEITOS DO VANADATO, INIBIDORES E SUBSTRATOS SOBRE A INTERAÇÃO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 5D3 À ABCG2

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Foi avaliado o efeito do vanadato, substrato e inibidores na fixação do anticorpo 5D3 em células HEK293ABCG2. A fluorescência (GMean) foi monitorada por citometria de fluxo usando 20 µL do anticorpo 5D3 conjugado com ficoeritrina, ou 20 µL do anticorpo controle (IgG2b), também conjugado com ficoeritrina como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.29. Foram realizados dois experimentos independentes e os resultados normalizados ao controle (ausência de compostos).

Para continuar explorando o mecanismo de inibição de ABCG2, as células HEK293ABCG2 foram incubadas com 5 mM de vanadato (Vi), o qual é um análogo

estrutural do fosfato e com maior afinidade, assim, o vanadato forma um complexo estável com o ADP (Vi-ADP) impedindo a liberação de ADP para que uma nova molécula de ATP se fixe (CANTLEY *et al.*, 1977). Como resultado da hidrólise do ATP em um primeiro ciclo de transporte, temos a estrutura do transportador aberta para o exterior e na presença de vanadato essa conformação é bloqueada. A exposição de 5 mM de vanadato por 10 minutos diminui a fluorescência emitida pelo anticorpo 5D3 (figura 48), confirmando alterações conformacionais, podendo sugerir que a estrutura aberta ao exterior aumenta a acessibilidade ao 5D3 e mais fechada, diminui.

Novamente foi observado que os substratos não alteram a fluorescência emitida pelo anticorpo 5D3 após prévia exposição ao vanadato (figura 49), confirmando o resultado obtido na ausência de vanadato. Foi observado que tanto o GF120918 quanto o Ko143 apresentaram a mesma tendência em aumentar a fluorescência do 5D3 (figura 49), tanto na presença quanto ausência de vanadato. Em contraste, a cromona **6a** apresentou um efeito inverso, diminuindo a acessibilidade do 5D3, sugerindo um sítio diferente do GF120918 e Ko143 (figura 49). O mesmo efeito de diminuição da fluorescência emitida pelo anticorpo 5D3 foi observado com o estilbeno **9**, confirmando a presença de um outro sítio de fixação para essa classe de inibidores (figura 49).

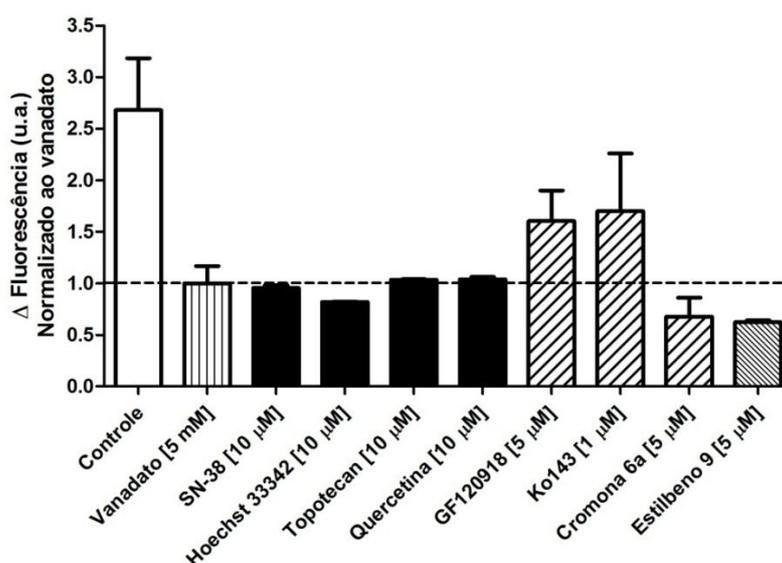


FIGURA 49 – EFEITOS DO VANADATO, INIBIDORES E SUBSTRATOS SOBRE A INTERAÇÃO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 5D3 À ABCG2 APÓS EXPOSIÇÃO AO VANADATO

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Foi avaliado o efeito dos substratos e inibidores na fixação do anticorpo 5D3 em células HEK293ABCG2 após exposição a 5 mM de vanadato por 10 minutos. A fluorescência (GMean) foi monitorada por citometria de fluxo usando 20  $\mu$ L do anticorpo 5D3 conjugado com ficoeritrina, ou 20  $\mu$ L do anticorpo controle (IgG2b), também conjugado com ficoeritrina de acordo com a seção de Materiais e Métodos item 4.29. Foram realizados dois experimentos independentes e os resultados normalizados ao controle tratado com vanadato.

Vários ensaios diferentes (atividade ATPase, tipo de inibição e bi-modulação) sugerem que o GF120918 e o estilbeno **9** possuem sítios de inibição diferentes. Para confirmar esses resultados, foi realizado um ensaio com GF120918 e o estilbeno **9** em duas concentrações diferentes sobre a acessibilidade do anticorpo conformacional 5D3 após exposição ao vanadato (figura 50). Esses resultados confirmam os resultados prévios indicados na figura 49 e mostram que o efeito sobre a acessibilidade do anticorpo 5D3 não é dependente da concentração do inibidor, pois utilizando os inibidores na concentração de 1  $\mu\text{M}$  o efeito foi semelhante ao observado com a utilização de 5  $\mu\text{M}$  do inibidor, tanto para o GF120918 quanto para o estilbeno **9** (figura 50). Esses resultados obtidos com uso do anticorpo conformacional 5D3, onde o GF120918 é capaz de aumentar a acessibilidade do anticorpo e o estilbeno **9** têm efeito inverso (na presença de vanadato = estrutura aberta ao exterior), sugerem que o estilbeno **9** apresenta preferência para se fixar quando a estrutura do transportador ABCG2 está aberta, já que na ausência de vanadato (estado basal), o estilbeno **9**, não apresentou efeito sobre a acessibilidade do anticorpo 5D3 (figura 48). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que substratos não induzem mudanças conformacionais detectáveis pelo uso do anticorpo 5D3 e que diferentes inibidores se comportam de diferentes maneiras, provavelmente devido a existência de sítios de inibição distintos no transportador ABCG2.

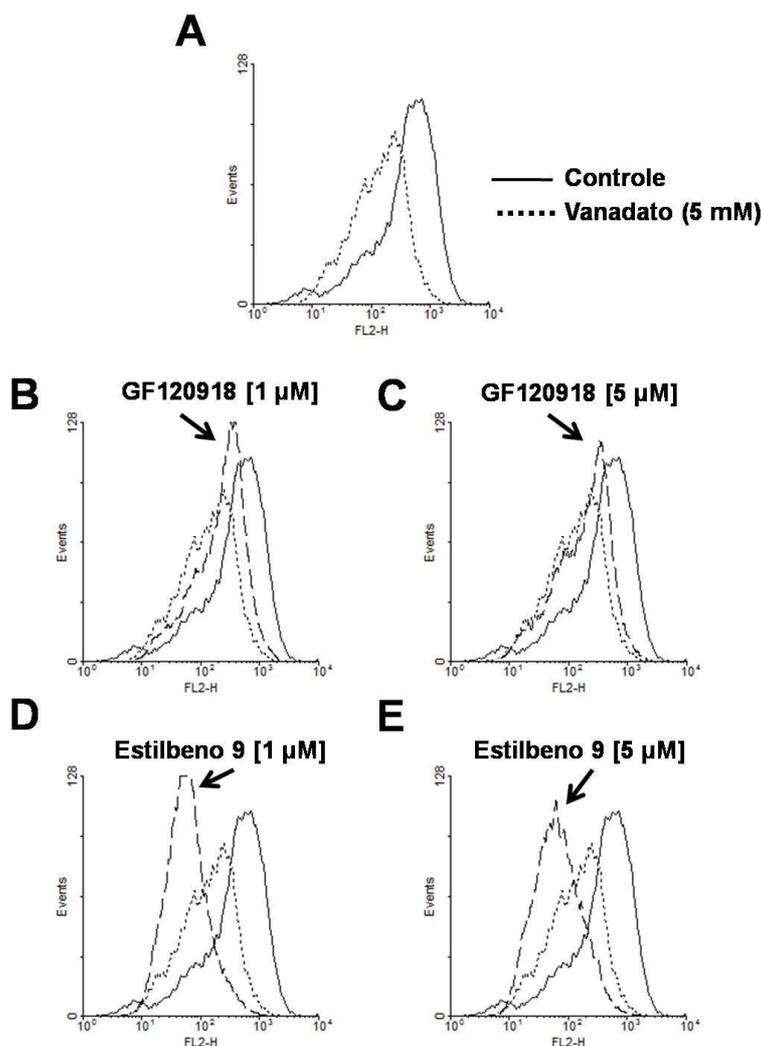


FIGURA 50 – EFEITOS DO GF120918 E ESTILBENO 9 SOBRE A INTERAÇÃO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 5D3 À ABCG2 APÓS EXPOSIÇÃO AO VANADATO  
 FONTE: O Autor (2012)

NOTA: Foi avaliado o efeito do GF120918 na fixação do anticorpo 5D3 em células HEK293ABCG2 após exposição a 5 mM de vanadato por 10 minutos. A fluorescência (GMean) foi monitorada por citometria de fluxo usando 20  $\mu$ L do anticorpo 5D3 conjugado com ficoeritrina, ou 20  $\mu$ L do anticorpo controle (IgG2b), também conjugado com ficoeritrina como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.29.

#### 5.6.5.6. MODELO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE SUBSTRATOS EM ABCG2

Norteados pelos resultados utilizando diferentes substratos e inibidores, pode-se sugerir um modelo de inibição para ABCG2 através de inibidores completos (que são capazes de bloquear 100% do transporte) e inibidores parciais (capazes de bloquear ~75% do transporte) (figura 51). Na parte superior da figura 51 foram posicionados inibidores completos (identificados pela letra 'l' em maiúsculo), os quais são capazes de bloquear 100% do transporte de diferentes substratos. Na parte inferior da figura 51 posicionamos inibidores parciais (identificados pela letra 'i' em

minúsculo), os quais são capazes de bloquear parcialmente os diferentes substratos, provavelmente por induzir diferentes mudanças conformacionais em ABCG2.

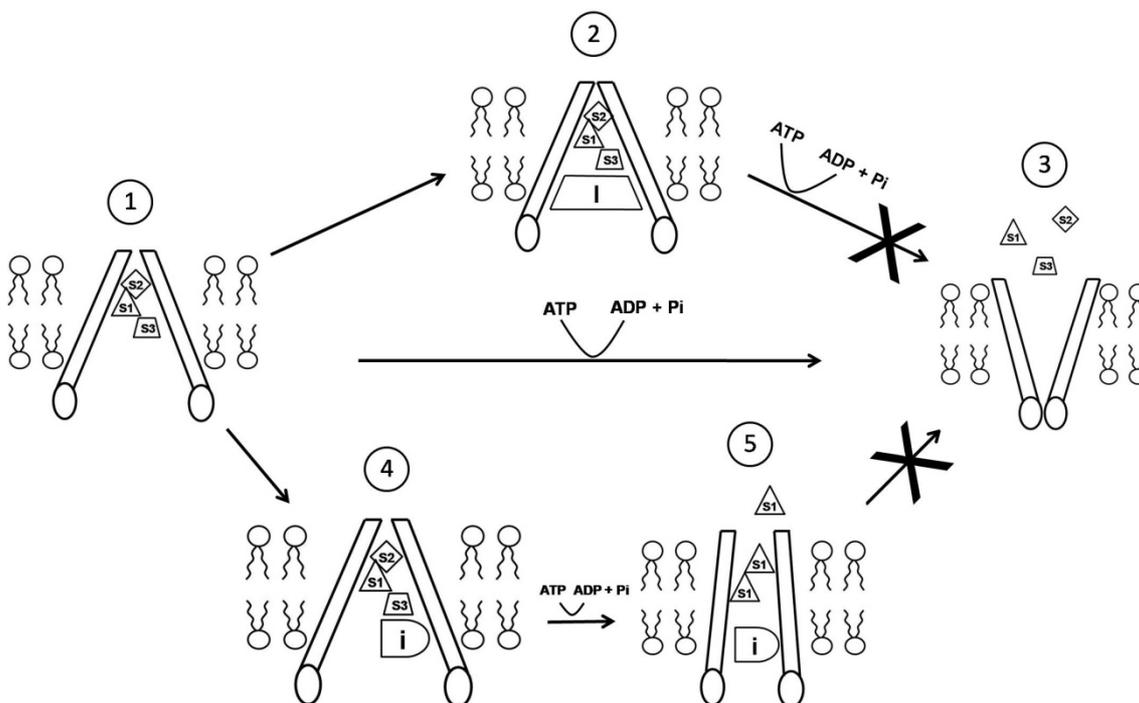


FIGURA 51 – MODELO DA AÇÃO DE DIFERENTES INIBIDORES DE ABCG2

FONTE: O Autor (2012)

NOTA: **I** = Inibidores capazes de bloquear 100% do transporte de substratos, **i** = Inibidores com efeito máximo de 75% de bloqueio do transporte, **S1**, **S2** e **S3** = diferentes tipos de substratos. (1) Estrutura fechada na presença de substratos; (2) estrutura fechada na presença de substratos e um inibidor que bloqueia 100% do transporte; (3) estrutura aberta ao exterior possibilitando a liberação dos substratos as custas de ATP na ausência de inibidor; (4) estrutura fechada na presença de substratos e um inibidor que bloqueia parcialmente o transporte; (5) estrutura parcialmente aberta ao exterior na presença de um inibidor parcial, que possibilita o transporte de uma pequena quantidade de substrato após hidrólise do ATP.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando comparados os efeitos citotóxicos da flavona *versus* apigenina em células HepG2 foi observado claramente que a apigenina é um melhor indutor de morte celular, quando comparado com a flavona nas mesmas doses e tempos (figura 16A e B). O fato de ambas as flavonas possuírem efeitos citotóxicos está de acordo com estudos que mostram que o grupo ceto em C<sub>4</sub> é essencial para o efeito antiproliferativo de flavonas em linhagens de células de câncer de mama (POUGET *et al.*, 2001). Contudo, no modelo utilizado no presente estudo pode-se atribuir essa maior citotoxicidade apresentada pela apigenina à presença de grupos hidroxil em sua estrutura, característica que a difere da flavona. Estes resultados concordam com os resultados de Yáñez e colaboradores (2004), que demonstraram que além da dupla ligação entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> a quantidade e distribuição de hidroxilas em flavonas alteram seus efeitos citotóxicos em linhagens de células de melanoma (YANEZ *et al.*, 2004), entretanto, não é possível saber quais grupamentos são essenciais para este efeito em células HepG2. É importante ressaltar que a morina, que pertence à classe dos flavonóis (que possuem um grupamento hidroxil em C<sub>3</sub>) não apresentou efeito citotóxico (tabela 7). Juntos, esses resultados demonstram a importância do núcleo base da flavona para a geração de seus efeitos sobre células HepG2 e também que a presença de grupamentos hidroxil presentes na estrutura da apigenina são capazes de modificar estes efeitos, levando a mecanismos de morte celular distintos.

Os resultados e hipóteses sugeridas neste trabalho sobre os diferentes mecanismos envolvidos no processo de morte em células HepG2 induzido por flavona e apigenina estão apresentados na figura 52. A hipótese de diferentes mecanismos envolvidos é apoiada pelos diferentes efeitos observados sobre os níveis de EROs e a expressão das enzimas antioxidantes. Enquanto que o tratamento de células HepG2 com apigenina diminuiu apenas os níveis de mRNA da catalase, o tratamento com flavona nas mesmas condições modulou os níveis de mRNA de todas as enzimas antioxidantes avaliadas, exceto a catalase. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram um envolvimento de EROs na morte celular induzida por apigenina e que a inibição da atividade da catalase e o conseqüente aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> têm um papel importante no mecanismo de indução de morte celular induzido pela apigenina. Entretanto, para a flavona, foi observado que provavelmente o mecanismo não envolve a via mitocondrial e aumento de EROs. Esses resultados fazem da flavona e apigenina bons candidatos para estudos em modelo *in vivo* para o tratamento de CHC.

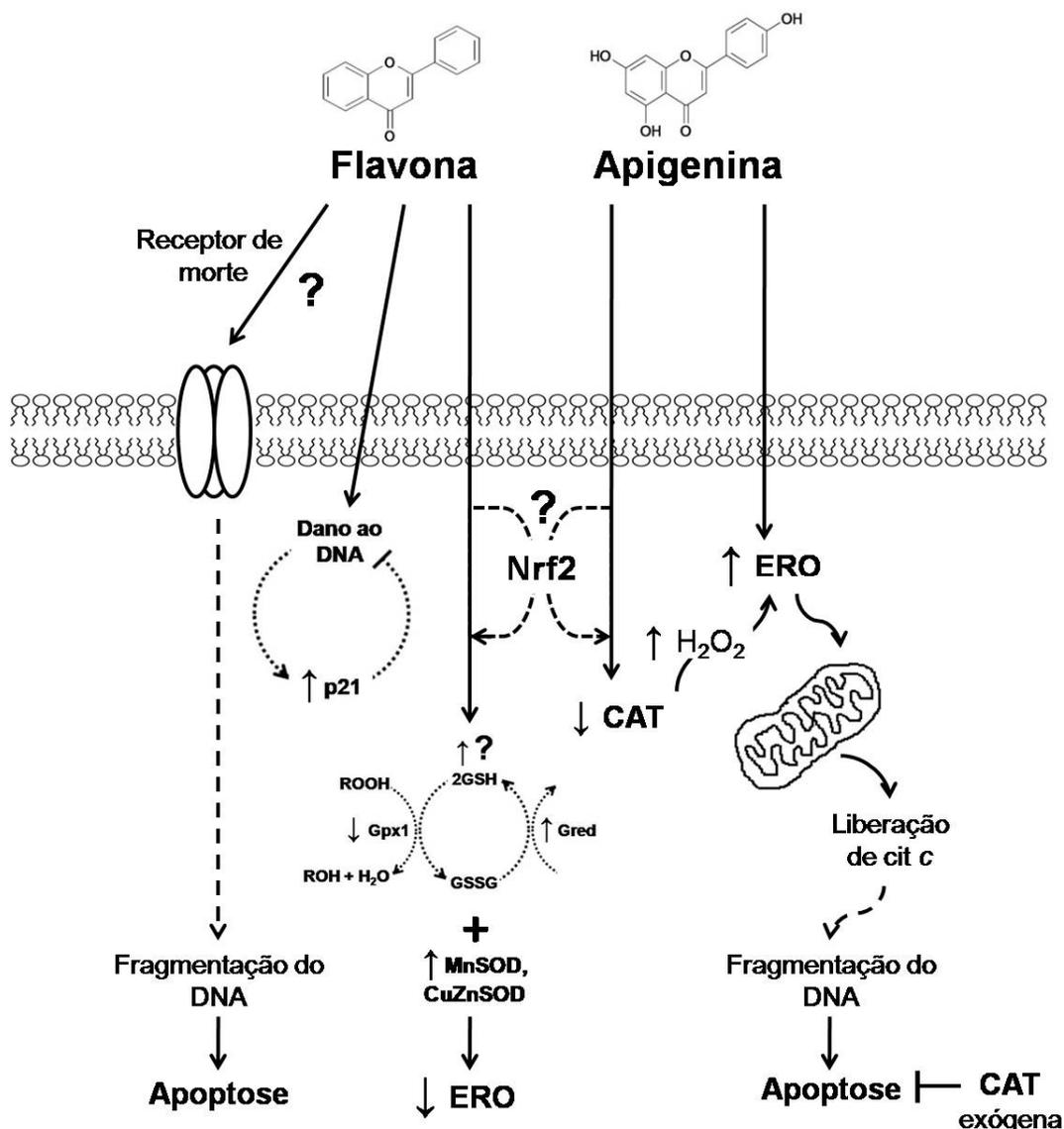


FIGURA 52 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS EFEITOS E HIPÓTESES DE MECANISMOS DE AÇÃO DA FLAVONA E DA APIGENINA SOBRE CÉLULAS HepG2  
 FONTE: O Autor (2012)

Nota: Nrf2, fator de transcrição nuclear eritróide-2; CAT, catalase; GSH, glutatona na forma reduzida; GSSG, glutatona na forma oxidada; cit c, citocromo c; MnSOD, manganês superóxido dismutase; CuZnSOD, cobre-zinco superóxido dismutase.

A identificação de novos inibidores de ABCG2 é até o momento a melhor estratégia para tentar reverter à resistência ao tratamento por quimioterápicos na clínica (BOUMENDJEL *et al.*, 2011). Nossa estratégia iniciou-se com a hispidulina, que infelizmente apresentou resultados abaixo das expectativas, porém foi possível identificar 3 classes de potentes inibidores de ABCG2, dentre estas, duas completamente originais (cromonas e estilbenos).

Apesar de recentemente as chalconas terem sido descritas como inibidores específicos de ABCG2 (Juvale *et al.*, 2011), as chalconas avaliadas nesse trabalho nos permitiram obter outras importantes informações sobre características estruturais para a inibição de ABCG2 e também sobre a citotoxicidade dessa classe de compostos. Até o momento não existe um candidato ideal para ensaios clínicos, porém, como descrito na discussão dos resultados das cromonas, a cromona **6g** (tabela 12) hoje se apresenta como o melhor inibidor de ABCG2 *in vitro* descrito na literatura, cumprindo vários pré-requisitos de um inibidor em potencial. Os resultados obtidos com os estilbenos permitiram identificar diferentes sítios de inibidores de ABCG2. Apesar dos estilbenos não inibirem completamente o transporte de substratos em ABCG2, foi possível explorar essa característica de maneira positiva, podendo comprovar pelo ensaio de bi-modulação o efeito aditivo do uso de dois inibidores de ABCG2. Os efeitos diferenciais obtidos pelo GF120918 *versus* estilbeno **9** permitiram melhor compreender o mecanismo de inibição de ABCG2, até então muito pouco explorado.

Os resultados obtidos neste trabalho sobre o mecanismo de inibição e transporte de ABCG2 mostraram que na maioria dos casos (com exceção da prazosina), um substrato é incapaz de inibir o transporte de outro, sugerindo que um ou mais substratos podem ser transportados ao mesmo tempo por ABCG2. Também foi demonstrado que inibidores de ABCG2 promovem uma inibição alostérica, provada pelas mudanças conformacionais detectadas pelo uso do anticorpo 5D3 e inibição de vários substratos diferentes além do tipo de inibição detectada que foi não-competitiva. Finalmente, um dos resultados de maior importância foi o de identificar a existência de diferentes sítios de inibição de ABCG2 (três ou mais), os quais futuramente poderão ser mapeados para o desenvolvimento de novas gerações de inibidores de ABCG2, cada vez mais específicos e potentes.

## 7. CONCLUSÕES

Em relação aos efeitos da flavona sobre células HepG2 pode-se concluir que:

- Induz morte em células de hepatocarcinoma humano (HepG2)
- Reduz os níveis de EROs e induz um aumento na expressão de algumas enzimas antioxidantes (CuZnSOD, MnSOD e Gred);
- O mecanismo de morte celular provavelmente não envolve a via mitocondrial e não é desencadeado por EROs;
- O provável mecanismo de morte celular é por apoptose.

Em relação aos efeitos da apigenina sobre células HepG2 pode-se concluir que:

- Existe um provável envolvimento de EROs em especial do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na sinalização da via de morte celular induzida pela apigenina;
- Promove uma diminuição na expressão e atividade de catalase, sem alterar as outras enzimas antioxidantes;
- Os efeitos sobre a catalase apresentam um papel central na indução de morte celular induzida pela apigenina;

Sobre os compostos testados como inibidores de ABCG2 pode-se concluir que:

- Todos os compostos testados; hispidulina, chalconas, cromonas e estilbenos são inibidores específicos de ABCG2.

Chalconas e análogos:

- Dentre as 44 chalconas e análogos testados neste trabalho, encontramos 6 (compostos **27**, **28**, **31**, **37**, **38** e **39**) que apresentaram um IC<sub>50</sub> inferior a 0,5 µM;
- Das chalconas mais ativas, duas (chalconas **27** e **38**) apresentaram baixa citotoxicidade e são bons candidatos para testes *in vivo*;

Cromonas:

- Possuem alta afinidade por ABCG2;

- Apresentam baixa citotoxicidade;
- Não são transportadas por ABCG2;
- São capazes de reverter o fenótipo de resistência à quimioterápicos após 72 horas de exposição sem alterar a expressão do transportador;
- A cromona **6g** é o melhor inibidor de ABCG2 já descrito na literatura, fazendo dele um excelente candidato para testes *in vivo*, os quais já estão sendo realizados no laboratório do Dr. Attilio Di Pietro.

Estilbenos:

- Possuem alta afinidade por ABCG2, porém inibem parcialmente o transporte de substratos;
- Apresentam baixa citotoxicidade;
- Revertem parcialmente o fenótipo de resistência à quimioterápicos após 72 horas de exposição;
- São inibidores não-competitivos;
- Fixam-se em ABCG2 em um sítio diferente do GF120918;
- Podem ser utilizados juntamente com outros inibidores em baixa concentração para promover 100% de inibição;

Sobre o mecanismo de inibição de ABCG2 pode-se concluir que:

- Um inibidor é capaz de inibir vários substratos de classes diferentes;
- Um substrato não inibe o transporte do outro;
- ABCG2 apresenta diferentes sítios para fixação de substratos e inibidores;
- Os inibidores induzem mudanças conformacionais em ABCG2;
- O mecanismo de inibição de ABCG2 é não-competitivo, podendo ser uma inibição parcial ou completa.

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. CATALASE INVITRO. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AHMED-BELKACEM, A.; MACALOU, S.; BORRELLI, F.; CAPASSO, R.; FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; DI PIETRO, A. Nonprenylated rotenoids, a new class of potent breast cancer resistance protein inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 1933-1938, 2007.

AHMED-BELKACEM, A.; POZZA, A.; MUNOZ-MARTINEZ, F.; BATES, S. E.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; DI PIETRO, A.; PEREZ-VICTORIA, J. M. Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenyichrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. **Cancer Research**, v. 65, p. 4852-4860, 2005a.

ALEXANDRAKIS, M.; LETOURNEAU, R.; KEMPURAJ, D.; GRZYBOWSKA, K. K.; HUANG, M.; CHRISTODOULOU, S.; BOUCHER, W.; SERETAKIS, D.; THEOHARIDES, T. C. Flavones inhibit proliferation and increase mediator content in human leukemic mast cells (HMC-1). **European Journal of Haematology**, v. 71, p. 448-454, 2003.

ALLEN, J. D.; VAN LOEVEZIJN, A.; LAKHAI, J. M.; VAN DER VALK, M.; VAN TELLINGEN, O.; REID, G.; SCHELLENS, J. H. M.; KOOMEN, G. J.; SCHINKEL, A. H. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 417-425, 2002.

ALLER, S. G.; YU, J.; WARD, A.; WENG, Y.; CHITTABOINA, S.; ZHUO, R. P.; HARRELL, P. M.; TRINH, Y. T.; ZHANG, Q. H.; URBATSCH, I. L.; CHANG, G. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. **Science**, v. 323, p. 1718-1722, 2009.

ALLIKMETS, R.; SCHRIML, L. M.; HUTCHINSON, A.; ROMANO-SPICA, V.; DEAN, M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. **Cancer Research**, v. 58, p. 5337-5339, 1998.

ANTELMANN, H.; HELMANN, J. D. Thiol-Based Redox Switches and Gene Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, p. 1049-1063, 2011.

APPAIX, F.; MINATCHY, M. N.; RIVA-LAVIEILLE, C.; OLIVARES, J.; ANTONSSON, B.; SAKS, V. A. Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1457, p. 175-181, 2000.

ARNAUD, O.; BOUMENDJEL, A.; GEZE, A.; HONORAT, M.; MATERA, E. L.; GUITTON, J.; STEIN, W. D.; BATES, S. E.; FALSON, P.; DUMONTET, C.; DI PIETRO, A.; PAYEN, L. The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan. **European Journal of Cancer**, v. 47, p. 640-648, 2011.

ATHAR, M.; BACK, J. H.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R.; KIM, A. L. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 486, p. 95-102, 2009.

BAER, M. R.; GEORGE, S. L.; DODGE, R. K.; O'LOUGHLIN, K. L.; MINDERMAN, H.; CALIGIURI, M. A.; ANASTASI, J.; POWELL, B. L.; KOLITZ, J. E.; SCHIFFER, C. A.; BLOOMFIELD, C. D.; LARSON, R. A. Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. **Blood**, v. 100, p. 1224-1232, 2002.

BAI, F. L.; MATSUI, T.; OHTANI-FUJITA, N.; MATSUKAWA, Y.; DING, Y.; SAKAI, T. Promoter activation and following induction of the p21/WAF1 gene by flavone is involved in G(1) phase arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. **Febs Letters**, v. 437, p. 61-64, 1998.

BENHAR, M.; ENGELBERG, D.; LEVITZKI, A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. **Embo Reports**, v. 3, p. 420-425, 2002.

BERTHET, C.; KALDIS, P. Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. **Oncogene**, v. 26, p. 4469-4477, 2007.

BLAGOSKLONNY, M. V. Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 1, p. 391-393, 2002.

BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. FRUIT, VEGETABLES, AND CANCER PREVENTION - A REVIEW OF THE EPIDEMIOLOGIC EVIDENCE. **Nutrition and Cancer-an International Journal**, v. 18, p. 1-29, 1992.

BOECK, P.; FALCAO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL, V.; TORRES-SANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1538-1545, 2006.

BOIS, F.; BENEY, C.; BOUMENDJEL, A.; MARIOTTE, A. M.; CONSEIL, G.; DI PIETRO, A. Halogenated chalcones with high-affinity binding to P-glycoprotein: Potential modulators of multidrug resistance. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 4161-4164, 1998.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. FLAVONOIDS AS ANTIOXIDANTS - DETERMINATION OF RADICAL-SCAVENGING EFFICIENCIES. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 343-355, 1990.

BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJNHOLDS, J. A family of drug transporters: The multidrug resistance-associated proteins. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, p. 1295-1302, 2000.

BOSCH, F. X.; RIBES, J.; DIAZ, M.; CLERIES, R. Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. **Gastroenterology**, v. 127, p. S5-S16, 2004.

BOUMENDJEL, A.; MACALOU, S.; AHMED-BELKACEM, A.; BLANC, M.; DI PIETRO, A. Acridone derivatives: design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. **Bioorg Med Chem**, v. 15, p. 2892-2897, 2007a.

BOUMENDJEL, A.; MACALOU, S.; AHMED-BELKACEM, A.; BLANC, M.; DI PIETRO, A. Acridone derivatives: Design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 2892-2897, 2007b.

BOUMENDJEL, A.; MACALOU, S.; VALDAMERI, G.; POZZA, A.; GAUTHIER, C.; ARNAUD, O.; NICOLLE, E.; MAGNARD, S.; FALSON, P.; TERREUX, R.; CARRUPT, P. A.; PAYEN, L.; DI PIETRO, A. Targeting the Multidrug ABCG2 Transporter with Flavonoidic Inhibitors: In Vitro Optimization and In Vivo Validation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3387-3401, 2011.

BOUMENDJEL, A.; RNOT, X.; BOUTONNAT, J. Chalcones Derivatives Acting as Cell Cycle Blockers: Potential Anti Cancer Drugs? **Current Drug Targets**, v. 10, p. 363-371, 2009.

BRADFORD, M. M. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BRECHBUHL, H. M.; GOULD, N.; KACHADOURIAN, R.; RIEKHOF, W. R.; VOELKER, D. R.; DAY, B. J. Glutathione Transport Is a Unique Function of the ATP-binding Cassette Protein ABCG2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 16582-16587, 2010.

BREEDVELD, P.; PLUIM, D.; CIPRIANI, G.; DAHLHAUS, F.; VAN EIJDHOVEN, M. A. J.; DE WOLF, C. J. F.; KUIL, A.; BEIJNEN, J. H.; SCHEFFER, G. L.; JANSEN, G.; BORST, P.; SCHELLENS, J. H. M. The effect of low pH on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, methotrexate diglutamate, folic acid, mitoxantrone, topotecan, and resveratrol in in vitro drug transport models. **Molecular Pharmacology**, v. 71, p. 240-249, 2007.

BRENDEL, C.; SCHARENBERG, C.; DOHSE, M.; ROBEY, R. W.; BATES, S. E.; SHUKLA, S.; AMBUDKAR, S. V.; WANG, Y.; WENNEMUTH, G.; BURCHERT, A.; BOUDRIOT, U.; NEUBAUER, A. Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. **Leukemia**, v. 21, p. 1267-1275, 2007.

BURGER, H.; VAN TOL, H.; BOERSMA, A. W.; BROK, M.; WIEMER, E. A.; STOTER, G.; NOOTER, K. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. **Blood**, v. 104, p. 2940-2942, 2004a.

BURGER, H.; VAN TOL, H.; BOERSMA, A. W. M.; BROK, M.; WIEMER, E. A. C.; STOLER, G.; NOOTER, K. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. **Blood**, v. 104, p. 2940-2942, 2004b.

CAI, Y.-Z.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 2872-2888, 2006.

CALLE, E. E.; RODRIGUEZ, C.; WALKER-THURMOND, K.; THUN, M. J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1625-1638, 2003.

CALLISTE, C. A.; LE BAIL, J. C.; TROUILLAS, P.; POUGET, C.; HABRIOUX, G.; CHULIA, A. J.; DUROUX, J. L. Chalcones: Structural requirements for antioxidant, estrogenic and antiproliferative activities. **Anticancer Research**, v. 21, p. 3949-3956, 2001.

CANTLEY, L. C.; JOSEPHSON, L.; WARNER, R.; YANAGISAWA, M.; LECHENE, C.; GUIDOTTI, G. VANADATE IS A POTENT (NA,K)-ATPASE INHIBITOR FOUND IN ATP DERIVED FROM MUSCLE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, p. 7421-7423, 1977.

CAO, G. H.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, p. 749-760, 1997.

CHEARWAE, W.; ANUCHAPREEDA, S.; NANDIGAMA, K.; AMBUDKAR, S. V.; LIMTRAKUL, P. Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein (ABCB1) by curcumin I, II, and III purified from Turmeric powder. **Biochem Pharmacol**, v. 68, p. 2043-2052, 2004.

CHEARWAE, W.; WU, C. P.; CHU, H. Y.; LEE, T. R.; AMBUDKAR, S. V.; LIMTRAKUL, P. Curcuminoids purified from turmeric powder modulate the function of human multidrug resistance protein 1 (ABCC1). **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 57, p. 376-388, 2006.

CHIANG LC, N. L., LIN IC, KUO PL, LIN CC. Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. **Cancer Lett.**, v. 237, p. 207-214, 2006.

CHOI, S. I.; JEONG, C. S.; CHO, S. Y.; LEE, Y. S. Mechanism of apoptosis induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells: Involvement of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, p. 1328-1335, 2007.

CHUNG, S. Y.; SUNG, M. K.; KIM, N. H.; JANG, J. O.; GO, E. J.; LEE, H. J. Inhibition of P-glycoprotein by natural products in human breast cancer cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p. 823-828, 2005.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, p. 749-762, 2010.

COLE, S. P. C.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J. H.; MACKIE, J. E.; GRANT, C. E.; ALMQUIST, K. C.; STEWART, A. J.; KURZ, E. U.; DUNCAN, A. M. V.; DEELEY, R. G. OVEREXPRESSION OF A TRANSPORTER GENE IN A MULTIDRUG-RESISTANT HUMAN LUNG-CANCER CELL-LINE. **Science**, v. 258, p. 1650-1654, 1992.

COORAY, H. C.; JANVILISRI, T.; VAN VEEN, H. W.; HLADKY, S. B.; BARRAND, M. A. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 317, p. 269-275, 2004.

CORRADINI, E.; FOGLIA, P.; GIANANTI, P.; GUBBIOTTI, R.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of

identification and quantitation in foods and plants. **Natural Product Research**, v. 25, p. 469-495, 2011.

CRIFE, L. D.; UNO, H.; PAIETTA, E. M.; LITZOW, M. R.; KETTERLING, R. P.; BENNETT, J. M.; ROWE, J. M.; LAZARUS, H. M.; LUGER, S.; TALLMAN, M. S. Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. **Blood**, v. 116, p. 4077-4085, 2010.

DABAGHI-BARBOSA, P.; ROCHA, A. M.; LIMA, A. F. D.; DE OLIVEIRA, B. H.; DE OLIVEIRA, M. B. M.; CARNIERI, E. G. S.; CADENA, S.; ROCHA, M. E. M. Hispidulin: Antioxidant properties and effect on mitochondrial energy metabolism. **Free Radical Research**, v. 39, p. 1305-1315, 2005.

DASSA, E.; BOUIGE, P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Research in Microbiology**, v. 152, p. 211-229, 2001.

DAWSON, R. J. P.; LOCHER, K. P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. **Nature**, v. 443, p. 180-185, 2006.

DEAN, M.; RZHETSKY, A.; ALLIKMETS, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Genome Research**, v. 11, p. 1156-1166, 2001.

DEEB, D.; GAO, X.; JIANG, H.; ARBAB, A. S.; DULCHAVSKY, S. A.; GAUTAM, S. C. Growth Inhibitory and Apoptosis-inducing Effects of Xanthohumol, a Prenylated Chalone Present in Hops, in Human Prostate Cancer Cells. **Anticancer Research**, v. 30, p. 3333-3339, 2010.

DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). **Febs Letters**, v. 580, p. 1103-1111, 2006.

DEGORTER, M. K.; CONSEIL, G.; DEELEY, R. G.; CAMPBELL, R. L.; COLE, S. P. C. Molecular modeling of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 365, p. 29-34, 2008.

DIESTRA, J. E.; SCHEFFER, G. L.; CATALA, I.; MALEIPAAD, M.; SCHELLENS, J. H. M.; SCHEPER, R. J.; GERMA-LLUCH, J. R.; IZQUIERDO, M. A. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. **Journal of Pathology**, v. 198, p. 213-219, 2002.

DONATO, F.; TAGGER, A.; GELATTI, U.; PARRINELLO, G.; BOFFETTA, P.; ALBERTINI, A.; DECARLI, A.; TREVISI, P.; RIBERO, M. L.; MARTELLI, C.; PORRU, S.; NARDI, G. Alcohol and hepatocellular carcinoma: The effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. **American Journal of Epidemiology**, v. 155, p. 323-331, 2002.

DOYLE, L. A.; YANG, W. D.; ABRUZZO, L. V.; KROGMANN, T.; GAO, Y. M.; RISHI, A. K.; ROSS, D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 15665-15670, 1998.

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 79-106, 2000.

ECKFORD, P. D. W.; SHAROM, F. J. ABC Efflux Pump-Based Resistance to Chemotherapy Drugs. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 2989-3011, 2009.

EL-SERAG, H. B. CURRENT CONCEPTS Hepatocellular Carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 1118-1127, 2011.

EL-SERAG, H. B.; LAU, M.; ESCHBACH, K.; DAVILA, J.; GOODWIN, J. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Hispanics in the United States. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, p. 1983-1989, 2007.

EL-SERAG, H. B.; MARRERO, J. A.; RUDOLPH, L.; REDDY, K. R. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1752-1763, 2008.

ELKIND, N. B.; SZENTPETERY, Z.; APATI, A.; OZVEGY-LACZKA, C.; VARADY, G.; UJHELLY, O.; SZABO, K.; HOMOLYA, L.; VARADI, A.; BUDAY, L.; KERI, G.; NEMET, K.; SARKADI, B. Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). **Cancer Res**, v. 65, p. 1770-1777, 2005.

ELSAYED, Y. A.; SAUSVILLE, E. A. Selected novel anticancer treatments targeting cell signaling proteins. **Oncologist**, v. 6, p. 517-537, 2001.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin naringenin. Dietary sources, bioactivities, and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, p. 851-874, 2004.

ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. **Advanced Protocols in Oxidative Stress II**, v. p. 57-72, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FORMENTO NAVARINI, A. L.; CHIARADIA, L. D.; MASCARELLO, A.; FRITZEN, M.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Hydroxychalcones induce apoptosis in B16-F10 melanoma cells via GSH and ATP depletion. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1630-1637, 2009.

GALIMBERTI, S.; GUERRINI, F.; PALUMBO, G. A.; CONSOLI, U.; FAZZI, R.; MORABITO, F.; SANTINI, V.; PETRINI, M. Evaluation of BCRP and MDR-1 co-expression by quantitative molecular assessment in AML patients. **Leukemia Research**, v. 28, p. 367-372, 2004.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUNEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 107-120, 2012.

GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; GRATACAP, M. P.; TULLIEZ, J.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **General Pharmacology**, v. 32, p. 279-286, 1999.

GARRETT, M. A. Cell cycle control and cancer. **Current Science**, v. 81, p. 515-522, 2001.

GISH, R. G.; PORTA, C.; LAZAR, L.; RUFF, P.; FELD, R.; CROITORU, A.; FEUN, L.; JEZIORSKI, K.; LEIGHTON, J.; KNOX, J.; GALLO, J.; KENNEALEY, G. T. Phase III randomized controlled trial comparing the survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with nolatrexed or doxorubicin (vol 25, pg 3069, 2007). **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, p. 4512-4512, 2007.

GUPTA, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 287, p. 914-920, 2001.

HALGREN, T. A. MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. **Journal of Computational Chemistry**, v. 20, p. 730-748, 1999.

HALL, M. D.; HANDLEY, M. D.; GOTTESMAN, M. M. Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, p. 546-556, 2009.

HAN, Y.; RIWANTO, M.; GO, M.-L.; EE, P. L. R. Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) by non-basic chalcone analogues. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, p. 30-41, 2008.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HARPER, C. E.; COOK, L. M.; PATEL, B. B.; WANG, J.; ELTOUM, I. A.; ARABSHAHI, A.; SHIRAI, T.; LAMARTINIERE, C. A. Genistein and Resveratrol, Alone and in Combination, Suppress Prostate Cancer in SV-40 Tag Rats. **Prostate**, v. 69, p. 1668-1682, 2009.

HE, L.; WU, Y.; LIN, L.; WANG, J.; WU, Y.; CHEN, Y.; YI, Z.; LIU, M.; PANG, X. Hispidulin, a small flavonoid molecule, suppresses the angiogenesis and growth of human pancreatic cancer by targeting vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Cancer Science**, v. 102, p. 219-225, 2011.

HEGEDUS, T.; ORFI, L.; SEPRODI, A.; VARADI, A.; SARKADI, B.; KERI, G. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. **Biochim Biophys Acta**, v. 1587, p. 318-325, 2002a.

HEGEDUS, T.; ORFI, L.; SEPRODI, A.; VARADI, A.; SARKADI, B.; KERI, G. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1587, p. 318-325, 2002b.

HEO, D. S.; PARK, J. G.; HATA, K.; DAY, R.; HERBERMAN, R. B.; WHITESIDE, T. L. EVALUATION OF TETRAZOLIUM-BASED SEMIAUTOMATIC COLORIMETRIC

ASSAY FOR MEASUREMENT OF HUMAN ANTITUMOR CYTOTOXICITY. **Cancer Research**, v. 50, p. 3681-3690, 1990.

HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; COVARRUBIAS, L. Interdigital cell death function and regulation: New insights on an old programmed cell death model. **Development Growth & Differentiation**, v. 53, p. 245-258, 2011.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. INTAKE OF POTENTIALLY ANTICARCINOGENIC FLAVONOIDS AND THEIR DETERMINANTS IN ADULTS IN THE NETHERLANDS. **Nutrition and Cancer-an International Journal**, v. 20, p. 21-29, 1993.

HIGGINS, C. F. ABC TRANSPORTERS - FROM MICROORGANISMS TO MAN. **Annual Review of Cell Biology**, v. 8, p. 67-113, 1992.

HOUGHTON, P. J.; GERMAIN, G. S.; HARWOOD, F. C.; SCHUETZ, J. D.; STEWART, C. F.; BUCHDUNGER, E.; TRAXLER, P. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. **Cancer Res**, v. 64, p. 2333-2337, 2004.

HSIEH, T.-C.; WU, J. M. Resveratrol: Biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule. **Biofactors**, v. 36, p. 360-369, 2010.

HU, J. P.; CALOMME, M.; LASURE, A.; DEBRUYNE, T.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.; VANDENBERGHE, D. A. STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP OF FLAVONOIDS WITH SUPEROXIDE SCAVENGING ACTIVITY. **Biological Trace Element Research**, v. 47, p. 327-331, 1995.

HU, Y.; YANG, Y.; YOU, Q.-D.; LIU, W.; GU, H.-Y.; ZHAO, L.; ZHANG, K.; WANG, W.; WANG, X.-T.; GUO, Q.-L. Oroxylin A induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was involved in its antitumor activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 351, p. 521-527, 2006.

INDRAN, I. R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1807, p. 735-745, 2011.

ISMAIL, N.; ALAM, M. A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 676-679, 2001.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 1865-1879, 2006.

JORDANIDES, N. E.; JORGENSEN, H. G.; HOLYOAKE, T. L.; MOUNTFORD, J. C. Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate. **Blood**, v. 108, p. 1370-1373, 2006.

JULIANO, R. L.; LING, V. SURFACE GLYCOPROTEIN MODULATING DRUG PERMEABILITY IN CHINESE-HAMSTER OVARY CELL MUTANTS. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 455, p. 152-162, 1976.

JUVALE, K.; PAPE, V. F. S.; WIESE, M. Investigation of chalcones and benzochalcones as inhibitors of breast cancer resistance protein. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 346-355, 2012.

KALE, A.; GAWANDE, S.; KOTWAL, S. Cancer phytotherapeutics: Role for flavonoids at the cellular level. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 567-577, 2008.

KATSORI, A.-M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Recent progress in therapeutic applications of chalcones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 21, p. 1575-1596, 2011.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. APOPTOSIS - BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE-RANGING IMPLICATIONS IN TISSUE KINETICS. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-&, 1972.

KIM, M. Y. Nitric oxide triggers apoptosis in A375 human melanoma cells treated. **Molecular medicine reports**, v. 5, p. 585-591, 2012.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 239-267, 2004.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; SEPPANEN, R.; HELIOVAARA, M.; TEPPONEN, L.; PUKKALA, E.; AROMAA, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, p. 223-230, 1997.

KOLITZ, J. E.; GEORGE, S. L.; DODGE, R. K.; HURD, D. D.; POWELL, B. L.; ALLEN, S. L.; VELEZ-GARCIA, E.; MOORE, J. O.; SHEA, T. C.; HOKE, E.; CALIGIURI, M. A.; VARDIMAN, J. W.; BLOOMFIELD, C. D.; LARSON, R. A. Dose escalation studies of cytarabine, daunorubicin, and etoposide with and without multidrug resistance modulation with PSC-833 in untreated adults with acute myeloid leukemia younger than 60 years: Final induction results of cancer and leukemia group B study 9621. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, p. 4290-4301, 2004.

KRISHAN, A. RAPID FLOW CYTOFLUOROMETRIC ANALYSIS OF MAMMALIAN-CELL CYCLE BY PROPIDIUM IODIDE STAINING. **Journal of Cell Biology**, v. 66, p. 188-193, 1975.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 99-163, 2007.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUNEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 3-11, 2009.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. QUANTIFICATION OF CELLS CULTURED ON 96-WELL PLATES. **Analytical Biochemistry**, v. 182, p. 16-19, 1989.

KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **European Journal of Nutrition**, v. 38, p. 133-142, 1999.

KUO, H.-M.; CHANG, L.-S.; LIN, Y.-L.; LU, H.-F.; YANG, J.-S.; LEE, J.-H.; CHUNG, J.-G. Inhibits the growth of human leukemia HL-60 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through mitochondria dependent pathway. **Anticancer Research**, v. 27, p. 395-405, 2007.

KUO, M. T. Redox Regulation of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 99-133, 2009.

KWEON, S. H.; SONG, J. H.; KIM, T. S. Resveratrol-mediated reversal of doxorubicin resistance in acute myeloid leukemia cells via downregulation of MRP1 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 395, p. 104-110, 2010.

LAMBETH, J. D.; KAWAHARA, T.; DIEBOLD, B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, p. 319-331, 2007.

LAU, A. T. Y.; WANG, Y.; CHIU, J.-F. Reactive oxygen species: Current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, p. 657-667, 2008.

LEE, D.-H.; KIM, C.; ZHANG, L.; LEE, Y. J. Role of p53, PUMA, and Bax in wogonin-induced apoptosis in human cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 2020-2033, 2008.

LEE, H.; YEOM, H.; KIM, Y. G.; YOON, C. N.; JIN, C. B.; CHOI, J. S.; KIM, B. R.; KIM, D. H. Structure-related inhibition of human hepatic caffeine N3-demethylation by naturally occurring flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 1369-1375, 1998.

LEE, H. J.; WANG, C. J.; KUO, H. C.; CHOU, F. P.; JEAN, L. F.; TSENG, T. H. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 124-131, 2005.

LEE, J. H.; JUNG, M. Y. Direct Spectroscopic Observation of Singlet Oxygen Quenching and Kinetic Studies of Physical and Chemical Singlet Oxygen Quenching Rate Constants of Synthetic Antioxidants (BHA, BHT, and TBHQ) in Methanol. **Journal of Food Science**, v. 75, p. C506-C513, 2010.

LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: The antioxidant concept revisited. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128, p. 336-374, 2010.

LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, p. 216-237, 2005.

LEUNG, H. W. C.; KUO, C. L.; YANG, W. H.; LIN, C. H.; LEE, H. Z. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 534, p. 12-18, 2006.

LEUNG, H. W. C.; WU, C. H.; LIN, C. H.; LEE, H. Z. Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 508, p. 77-83, 2005.

LI, L.; WEI, X. H.; PAN, Y. P.; LI, H. C.; YANG, H.; HE, Q. H.; PANG, Y.; SHAN, Y.; XIONG, F. X.; SHAO, G. Z.; ZHOU, R. L. LAPTM4B: A novel cancer-associated gene motivates multidrug resistance through efflux and activating PI3K/AKT signaling. **Oncogene**, v. 29, p. 5785-5795, 2010.

LIN, H.; XIONG, W.; ZHANG, X.; LIU, B.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; CHENG, J.; HUANG, H. Notch-1 activation-dependent p53 restoration contributes to resveratrol-induced apoptosis in glioblastoma cells. **Oncology Reports**, v. 26, p. 925-930, 2011.

LIN, Y.-C.; HUNG, C.-M.; TSAI, J.-C.; LEE, J.-C.; CHEN, Y.-L. S.; WEI, C.-W.; KAO, J.-Y.; WAY, T.-D. Hispidulin Potently Inhibits Human Glioblastoma Multiforme Cells through Activation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9511-9517, 2010.

LIST, A. F.; KOPECKY, K. J.; WILLMAN, C. L.; HEAD, D. R.; PERSONS, D. L.; SLOVAK, M. L.; DORR, R.; KARANES, C.; HYNES, H. E.; DOROSHOW, J. H.; SHURAF, M.; APPELBAUM, F. R. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. **Blood**, v. 98, p. 3212-3220, 2001.

LIU, X.-L.; TEE, H.-W.; GO, M.-L. Functionalized chalcones as selective inhibitors of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 171-180, 2008.

LLOVET, J. M.; RICCI, S.; MAZZAFERRO, V.; HILGARD, P.; GANE, E.; BLANC, J. F.; DE OLIVEIRA, A. C.; SANTORO, A.; RAOUL, J. L.; FORNER, A.; SCHWARTZ, M.; PORTA, C.; ZEUZEM, S.; BOLONDI, L.; GRETEN, T. F.; GALLE, P. R.; SEITZ, J. F.; BORBATH, I.; HAUSSINGER, D.; GIANNARIS, T.; SHAN, M.; MOSCOVICI, M.; VOLIOTIS, D.; BRUIX, J. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma (vol 359, pg 378, 2008). **New England Journal of Medicine**, v. 359, p. 2508-2508, 2008.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. PROGRAMMED CELL DEATH .2. ENDOCRINE POTENTIATION OF THE BREAKDOWN OF THE INTERSEGMENTAL MUSCLES OF SILKMOTHS. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, p. 643-649, 1964.

LU, H.-P.; CHIE, Y.-J.; YANG, M.-S.; LEE, C.-S.; FU, J.-J.; YANG, J.-S.; TAN, T.-W.; WU, S.-H.; MA, Y.-S.; IP, S.-W.; CHUNG, J.-G. Apigenin induces caspase-dependent apoptosis in human lung cancer A549 cells through Bax- and Bcl-2-triggered mitochondrial pathway. **International Journal of Oncology**, v. 36, p. 1477-1484, 2010.

MARTENS, S.; MITHOFER, A. Flavones and flavone synthases (vol 66, pg 2399, 2005). **Phytochemistry**, v. 67, p. 521-521, 2006.

MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, p. 1-15, 2002.

MCCORD, J. M.; FRIDOVIC, I. SUPEROXIDE DISMUTASE AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-8, 1969.

MICHELS, G.; WATJEN, W.; NIERING, P.; STEFFAN, B.; THI, Q. H. T.; CHOVOLOU, Y.; KAMPKOTTER, A.; BAST, A.; PROKSCH, P.; KAHL, R. Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H411E cells. **Toxicology**, v. 206, p. 337-348, 2005.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673-751, 2000.

MIYAKE, K.; MICKLEY, L.; LITMAN, T.; ZHAN, Z. R.; ROBEY, R.; CRISTENSEN, B.; BRANGI, M.; GREENBERGER, L.; DEAN, M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: Demonstration of homology to ABC transport genes. **Cancer Research**, v. 59, p. 8-13, 1999.

MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Structure-antioxant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. **Food Chemistry**, v. 92, p. 349-355, 2005.

MORGAN, D. O. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13, p. 261-291, 1997.

MORRISSEY, C.; O'NEILL, A.; SPENGLER, B.; CHRISTOFFEL, V.; FITZPATRICK, J. M.; WATSON, R. W. G. Apigenin drives the production of reactive oxygen species and initiates a mitochondrial mediated cell death pathway in prostate epithelial cells. **Prostate**, v. 63, p. 131-142, 2005.

NAKANISHI, T.; SHIOZAWA, K.; HASSEL, B. A.; ROSS, D. D. Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression. **Blood**, v. 108, p. 678-684, 2006.

NEZIS, I. P.; SHRAVAGE, B. V.; SAGONA, A. P.; LAMARK, T.; BJORKOY, G.; JOHANSEN, T.; RUSTEN, T. E.; BRECH, A.; BAEHRECKE, E. H.; STENMARK, H. Autophagic degradation of dBruce controls DNA fragmentation in nurse cells during late *Drosophila melanogaster* oogenesis. **Journal of Cell Biology**, v. 190, p. 523-531, 2010.

NICOLLE, E.; BOCCARD, J.; GUILLET, D.; DIJOUX-FRANCA, M.-G.; ZELEFAC, F.; MACALOU, S.; GROSSELIN, J.; SCHMIDT, J.; CARRUPT, P.-A.; DI PIETRO, A.; BOUMENDJEL, A. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): New inhibitors and QSAR studies by a 3D linear solvation energy approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 39-46, 2009a.

NICOLLE, E.; BOUMENDJEL, A.; MACALOU, S.; GENOUX, E.; AHMED-BELKACEM, A.; CARRUPT, P. A.; DI PIETRO, A. QSAR analysis and molecular modeling of ABCG2-specific inhibitors. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 34-46, 2009b.

OCETE, M. A.; GALVEZ, J.; CRESPO, M. E.; CRUZ, T.; GONZALEZ, M.; TORRES, M. I.; ZARZUELO, A. Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. **Pharmacology**, v. 57, p. 261-270, 1998.

OSBURN, W. O.; KENSLER, T. W. Nrf2 signaling: An adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, v. 659, p. 31-39, 2008.

PATEL D, S. S., GUPTA S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). **Int J Oncol.**, v. 30, p. 233-245, 2007.

PERVAIZ, S.; HOLME, A. L. Resveratrol: Its Biologic Targets and Functional Activity. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 2851-2897, 2009.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1995-2018, 1998.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2001.

PICK, A.; MUELLER, H.; MAYER, R.; HAENISCH, B.; PAJEVA, I. K.; WEIGT, M.; BOENISCH, H.; MUELLER, C. E.; WIESE, M. Structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2090-2102, 2011.

PICK, A.; MUELLER, H.; WIESE, M. Novel lead for potent inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 180-183, 2010.

POUGET, C.; LAUTHIER, F.; SIMON, A.; FAGNERE, C.; BASLY, J. P.; DELAGE, C.; CHULIA, A. J. Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 3095-3097, 2001.

POZZA, A.; PEREZ-VICTORIA, J. M.; SARDO, A.; AHMED-BELKACEM, A.; DI PIETRO, A. Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 1912-1922, 2006.

PRIMIANO, T.; YU, R.; KONG, A. N. T. Signal transduction events elicited by natural products that function as cancer chemopreventive agents. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, p. 83-107, 2001.

RABINDRAN, S. K.; HE, H. Y.; SINGH, M.; BROWN, E.; COLLINS, K. I.; ANNABLE, T.; GREENBERGER, L. M. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. **Cancer Research**, v. 58, p. 5850-5858, 1998.

RABINDRAN, S. K.; ROSS, D. D.; DOYLE, L. A.; YANG, W. D.; GREENBERGER, L. M. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. **Cancer Research**, v. 60, p. 47-50, 2000.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 797-807, 2001.

ROBERT, J.; JARRY, C. Multidrug resistance reversal agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4805-4817, 2003.

ROBEY, R. W.; HONJO, Y.; VAN DE LAAR, A.; MIYAKE, K.; REGIS, J. T.; LITMAN, T.; BATES, S. E. A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2). **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1512, p. 171-182, 2001.

RUSAK, G.; GUTZEIT, H. O.; LUDWIG-MULLER, J. Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells. **Nutrition Research**, v. 25, p. 143-155, 2005.

SAEKI, T.; NOMIZU, T.; TOI, M.; ITO, Y.; NOGUCHI, S.; KOBAYASHI, T.; ASAGA, T.; MINAMI, H.; YAMAMOTO, N.; AOGI, K.; IKEDA, T.; OHASHI, Y.; SATO, W.; TSURUO, T. Dofequidar fumarate (MS-209) in combination with cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil for patients with advanced or recurrent breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, p. 411-417, 2007.

SAITO, M.; SAKAGAMI, H.; FUJISAWA, S. Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). **Anticancer Research**, v. 23, p. 4693-4701, 2003.

SANJEEV SHUKLA, S. G. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 1833-1845, 2008.

SARKADI, B.; OZVEGY-LACZKA, C.; NEMET, K.; VARADI, A. ABCG2 - a transporter for all seasons. **Febs Letters**, v. 567, p. 116-120, 2004.

SAURIN, W.; HOFNUNG, M.; DASSA, E. Getting in or out: Early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, p. 22-41, 1999.

SCHARENBERG, C. W.; HARKEY, M. A.; TOROK-STORB, B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. **Blood**, v. 99, p. 507-512, 2002.

SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 3-29, 2003.

SCHINKEL, A. H.; SMIT, J. J. M.; VANTELLINGEN, O.; BEIJNEN, J. H.; WAGENAAR, E.; VANDEEMTER, L.; MOL, C.; VANDERVALK, M. A.; ROBANUSMAANDAG, E. C.; TERIELE, H. P. J.; BERNS, A. J. M.; BORST, P. DISRUPTION OF THE MOUSE MDR1A P-GLYCOPROTEIN GENE LEADS TO A DEFICIENCY IN THE BLOOD-BRAIN-BARRIER AND TO INCREASED SENSITIVITY TO DRUGS. **Cell**, v. 77, p. 491-502, 1994.

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

SCHWEICHJU; MERKER, H. J. MORPHOLOGY OF VARIOUS TYPES OF CELL DEATH IN PRENATAL TISSUES. **Teratology**, v. 7, p. 253-266, 1973.

SCOTTO, K. W. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. **Oncogene**, v. 22, p. 7496-7511, 2003.

SHAPIRO, A. B.; LING, V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. **Eur J Biochem**, v. 250, p. 130-137, 1997.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G(1)-phase progression. **Genes & Development**, v. 13, p. 1501-1512, 1999.

SHI, H. L.; HUDSON, L. G.; LIU, K. J. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 582-593, 2004.

SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, p. 1833-1845, 2008.

SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 962-978, 2010.

SHUKLA, S.; WU, C.-P.; AMBUDKAR, S. V. Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters - present status and challenges. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, p. 205-223, 2008a.

SHUKLA, S.; WU, C. P.; AMBUDKAR, S. V. Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 4, p. 205-223, 2008b.

SIES, H.; KOCH, O. R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. INCREASED BILIARY GLUTATHIONE DISULFIDE RELEASE IN CHRONICALLY ETHANOL-TREATED RATS. **Febs Letters**, v. 103, p. 287-290, 1979.

SUKARDIMAN; DARWANTO, A.; TANJUNG, M.; DARMADI, M. O. Cytotoxic mechanism of flavonoid from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) in cell culture of human mammary carcinoma. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 23, p. 185-190, 2000.

SZAKACS, 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.

TAMAKI, A.; IERANO, C.; SZAKACS, G.; ROBEY, R. W.; BATES, S. E. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. **Essays in Biochemistry: Abc Transporters**, v. 50, p. 209-232, 2011.

TANG, X.; WANG, H.; FAN, L.; WU, X.; XIN, A.; REN, H.; WANG, X. J. Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, p. 1599-1609, 2011.

TANIGAWA, S.; FUJII, M.; HOU, D. X. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, p. 1690-1703, 2007.

TELBISZ, A.; HEGEDUS, C.; OZVEGY-LACZKA, C.; GODA, K.; VARADY, G.; TAKATS, Z.; SZABO, E.; SORRENTINO, B. P.; VARADI, A.; SARKADI, B. Antibody binding shift assay for rapid screening of drug interactions with the human ABCG2 multidrug transporter. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 101-109, 2012.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, p. L1005-L1028, 2000.

THIEBAUT, F.; TSURUO, T.; HAMADA, H.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I.; WILLINGHAM, M. C. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, p. 7735-7738, 1987.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, p. 147-157, 2006.

TSUJI, P. A.; WALLE, T. Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, p. 37-44, 2008.

TSUKIYAMA, R. I.; KATSURA, H.; TOKURIKI, N.; KOBAYASHI, M. Antibacterial activity of licochalcone A against spore-forming bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1226-1230, 2002.

TU, H.-C.; REN, D.; WANG, G. X.; CHEN, D. Y.; WESTERGARD, T. D.; KIM, H.; SASAGAWA, S.; HSIEH, J. J. D.; CHENG, E. H. Y. The p53-cathepsin axis cooperates with ROS to activate programmed necrotic death upon DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 1093-1098, 2009.

UEDA, S.; NAKAMURA, H.; MASUTANI, H.; SASADA, T.; TAKABAYASHI, A.; YAMAOKA, Y.; YODOI, J. Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 781-791, 2002.

ULLMANNOVA, V.; POPESCU, N. C. Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis, reactivation of DLC1, and modulation of other gene expression by dietary flavone in breast cancer cell lines. **Cancer Detection and Prevention**, v. 31, p. 110-118, 2007.

VALDAMERI, G.; GENOUX-BASTIDE, E.; PERES, B.; GAUTHIER, C.; GUITTON, J.; TERREUX, R.; WINNISCHOFER, S. M. B.; ROCHA, M. E. M.; BOUMENDJEL, A.; DI PIETRO, A. Substituted Chromones as Highly Potent Nontoxic Inhibitors, Specific for the Breast Cancer Resistance Protein. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 966-970, 2012a.

VALDAMERI, G.; HERRERIAS, T.; CARNIERI, E. G. S.; CADENA, S.; MARTINEZ, G. R.; ROCHA, M. E. M. Importance of the core structure of flavones in promoting inhibition of the mitochondrial respiratory chain. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 52-58, 2010.

VALDAMERI, G.; PEREIRA RANGEL, L.; SPATAFORA, C.; GUITTON, J.; GAUTHIER, C.; ARNAUD, O.; FERREIRA-PEREIRA, A.; FALSON, P.; WINNISCHOFER, S. M. B.; ROCHA, M. E. M.; TRINGALI, C.; PIETRO, A. D. Methoxy stilbenes as potent, specific, untransported, and noncytotoxic inhibitors of breast cancer resistance protein. **ACS chemical biology**, v. 7, p. 322-330, 2012b.

VANDENABEELE, P.; GALLUZZI, L.; VANDEN BERGHE, T.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, p. 700-714, 2010.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, p. 2002.

VARGO, M. A.; VOSS, O. H.; POUSTKA, F.; CARDOUNEL, A. J.; GROTEWOLD, E.; DOSEFF, A. I. Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKC delta and caspases in leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 681-692, 2006.

VLAMING, M. L. H.; LAGAS, J. S.; SCHINKEL, A. H. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): Recent findings in Abcg2 knockout mice. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 14-25, 2009.

VOUSDEN, K. H. Outcomes of p53 activation - spoilt for choice. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 5015-5020, 2006.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: More than a paradigm. **Science**, v. 296, p. 1635-1636, 2002.

WANG, I. K.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. **European Journal of Cancer**, v. 35, p. 1517-1525, 1999.

WANG, J.; YI, J. Cancer cell killing via ROS To increase or decrease, that is the question. **Cancer Biology & Therapy**, v. 7, p. 1875-1884, 2008.

WANG, T. T. Y.; HUDSON, T. S.; WANG, T.-C.; REMSBERG, C. M.; DAVIES, N. M.; TAKAHASHI, Y.; KIM, Y. S.; SEIFRIED, H.; VINYARD, B. T.; PERKINS, S. N.; HURSTING, S. D. Differential effects of resveratrol on androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cells in vitro and in vivo. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 2001-2010, 2008.

WANG, W. Q.; HEIDEMAN, L.; CHUNG, C. S.; PELLING, J. C.; KOEHLER, K. J.; BIRT, D. F. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. **Molecular Carcinogenesis**, v. 28, p. 102-110, 2000.

WATTENBERG, L. W. Overview of chemoprevention: Current status and future prospects. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 216, p. 133-141, 1997.

WAY, T. D.; KAO, M. C.; LIN, J. K. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 4479-4489, 2004.

WENZEL, H.; KUNTZ, S.; BRENDEL, M. D.; DANIEL, H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. **Cancer Research**, v. 60, p. 3823-3831, 2000.

WENZEL, U.; NICKEL, A.; DANIEL, H. Increased mitochondrial palmitoylcarnitine/carnitine countertransport by flavone causes oxidative stress and apoptosis in colon cancer cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 3100-3105, 2005.

WINTER, E.; CHIARADIA, L. D.; DE CORDOVA, C. A. S.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Naphthylchalcones induce apoptosis and caspase activation in a leukemia cell line: The relationship between mitochondrial damage, oxidative stress, and cell death. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 8026-8034, 2010.

WOO, S. H.; PARK, I. C.; PARK, M. J.; AN, S.; LEE, H. C.; JIN, H. O.; PARK, S. A.; CHO, H. Y.; LEE, S. J.; GWAK, H. S.; HONG, Y. J.; HONG, S. I.; RHEE, C. H. Arsenic trioxide sensitizes CD95/Fas-induced apoptosis through ROS-mediated upregulation of CD95/Fas by NF-kappa B activation. **International Journal of Cancer**, v. 112, p. 596-606, 2004.

WRZESINSKI, S. H.; TADDEI, T. H.; STRAZZABOSCO, M. Systemic Therapy in Hepatocellular Carcinoma. **Clinics in Liver Disease**, v. 15, p. 423+, 2011.

YANEZ, J.; VICENTE, V.; ALCARAZ, M.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCIA, O.; CANTERAS, M.; TERUEL, J. A. L. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: Relationship between structure and activity. **Nutrition and Cancer-an International Journal**, v. 49, p. 191-199, 2004.

YANG, J.-M.; HUNG, C.-M.; FU, C.-N.; LEE, J.-C.; HUANG, C.-H.; YANG, M.-H.; LLN, C.-L.; KAO, J.-Y.; WAY, T.-D. Hispidulin Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by AMPK Activation Leading to Mcl-1 Block in Translation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10020-10026, 2010.

YEO, W.; MOK, T. S.; ZEE, B.; LEUNG, T. W. T.; LAI, P. B. S.; LAU, W. Y.; KOH, J.; MO, F. K. F.; YU, S. C. H.; T CHAN, A.; HUI, P.; MA, B.; LAM, K. C.; HO, W. M.; WONG, H. T.; TANG, A.; JOHNSON, P. J. A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, p. 1532-1538, 2005.

ZANETTI, A. R.; VAN DAMME, P.; SHOUVAL, D. The global impact of vaccination against hepatitis B: A historical overview. **Vaccine**, v. 26, p. 6266-6273, 2008.

ZHANG, S. Z.; YANG, X. N.; MORRIS, M. E. Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. **Molecular Pharmacology**, v. 65, p. 1208-1216, 2004.

ZHANG, W.; WANG, X.; CHEN, T. Resveratrol induces mitochondria-mediated AIF and to a lesser extent caspase-9-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma ASTC-a-1 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 354, p. 29-37, 2011.

ZHENG, P. W.; CHIANG, L. C.; LIN, C. C. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. **Life Sciences**, v. 76, p. 1367-1379, 2005.

# ANEXOS