

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA TREVISAN BRONISLAWSKI

ESTABELECIMENTO DE UMA LINHAGEM DE MELANOMA B16F10  
SUPEREXPRESSANDO Abcg2 PARA AVALIAÇÃO FUTURA DE INIBIDORES  
EM MODELOS METASTÁTICOS MURINOS E MEMBRANA  
CORIOALANTOIDE

CURITIBA, 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA TREVISAN BRONISLAWSKI

ESTABELECIMENTO DE UMA LINHAGEM DE MELANOMA B16F10  
SUPEREXPRESSANDO Abcg2 PARA AVALIAÇÃO FUTURA DE INIBIDORES  
EM MODELOS METASTÁTICOS MURINOS E MEMBRANA  
CORIOALANTOIDE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Glaucio Valdameri.

Co-orientador: Prof. Dra. Vivian Rotuno Moure Valdameri

CURITIBA, 2025

Bronislawsk, Fernanda Trevisan

Estabelecimento de uma linhagem de melanoma B16F10 superexpressando abcg2 para avaliação futura de inibidores em modelos metastáticos murinos e membrana corioalantoide [recurso eletrônico] / Fernanda Trevisan Bronislawsk. – Curitiba, 2025.

1 recurso online : PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas .

Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2025.

Orientador: Prof. Dr. Glaucio Valdameri

Coorientador: Prof. Dra. Vivian Rotuno Moure Valdameri

1. Resistência a medicamentos. 2. Transportadores ABC. 3. Transportadores de Cassetes de Ligação de ATP. 4. Cromonas. 5. Metástase neoplásica - Murinos. 6. Membrana corioalantoide. I. Valdameri, Glaucio. II. Valdameri, Vivian Rotuno Moure. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FERNANDA TREVISAN BRONISLAWSKI**, intitulada: **ESTABELECIMENTO DE UMA LINHAGEM DE MELANOMA B16F10 SUPEREXPRESSANDO Abcg2 PARA AVALIAÇÃO FUTURA DE INIBIDORES EM MODELOS METASTÁTICOS MURINOS E MEMBRANA CORIOALANTOIDE.**, sob orientação do Prof. Dr. GLAUCIO VALDAMERI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Novembro de 2025.

Assinatura Eletrônica

28/11/2025 15:44:58.0

GLAUCIO VALDAMERI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/12/2025 11:13:16.0

LUIZ FERNANDO PEREIRA

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/PR)

Assinatura Eletrônica

28/11/2025 16:08:05.0

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR)

---

Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4098 - E-mail: cfufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 500763

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 500763

Dedico este trabalho a todos que estiveram ao meu lado durante essa jornada incrível do mestrado. À minha irmã, Ana Paula; aos meus pais, Luiz e Luciana; ao meu namorado, Lucas; à minha avó, Maria Cristina e toda minha família, aos meus amigos, em especial a Letícia; aos meus orientadores e todos que contribuíram com meu projeto. Expresso meus sinceros agradecimentos a todos pelo apoio durante esta fase desafiadora e maravilhosa da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

O desenvolvimento desse projeto de pesquisa foi possível graças ao apoio e dedicação de diversas pessoas, as quais eu gostaria de expressar meus profundos agradecimentos.

À minha irmã, Ana Paula, meu primeiro grande amor. Agradeço por, mesmo pequena para entender sobre pesquisa, me apoiar sempre com sua grande empatia e carinho. Aos meus pais, Luiz e Luciana, por me oferecerem a oportunidade de seguir meus sonhos e me incentivarem todos os dias a ser corajosa e dedicada, vocês sempre foram e serão meu maior exemplo para dentro e fora da vida acadêmica.

Ao meu namorado e melhor amigo, Lucas. Esse trabalho só foi possível graças ao seu apoio em cada etapa do processo, desde a inoculação de células e cultivo celular, você esteve lá em cada etapa. Agradeço por acreditar em mim, agradeço por ser meu companheiro de laboratório e de vida.

A minha avó, Maria Cristina, por sempre acreditar na minha capacidade. A minha tia-avó, Marta, por me criar como neta também. Aos meus falecidos avós, Ivo, Felícia e Estanislau, os quais penso constantemente e gostaria muito de ter tido a oportunidade de conhecê-los.

Aos meus amigos, que me apoiaram em todas as fases da vida e todos os meus projetos, em especial a Letícia, sou grata pelo seu apoio e sua lealdade e me inspiro em sua autenticidade.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Glaucio Valdameri e Profa. Dra. Vivian Rotuno Moure Valdameri, que sempre estiveram ao meu lado em toda a trajetória, me ensinando e me trazendo inúmeras oportunidades. Agradeço e me inspiro em vocês todos os dias.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, que me ensinaram, me acolheram e me fizeram sentir parte do grupo LCDR. Serei sempre grata pelas amizades que fiz e por tudo que aprendi com todos.

Ao professor Luiz Fernando do Laboratório de Biologia Experimental da PUCPR, por todos os ensinamentos, oportunidades e apoio. Agradeço também a todos os estagiários do laboratório que me auxiliaram durante o projeto.

Ao Kauê, do Laboratório de Farmacologia e Metabolismo da UFPR, agradeço por ensinar técnicas e disponibilizar espaço e tempo para realizarmos os testes iniciais com os camundongos.

À Aliciane, Jacqueline e Micheli, do Departamento de Biologia Celular e Molecular da UFPR, pelos ensinamentos no manejo, inoculação de animais em pesquisa e imagens.

Aos membros da banca avaliadora, Prof. Dr. Luiz Fernando Pereira e Profa. Dra. Fernanda Fogagnoli Simas agradeço pela disponibilidade e pelo tempo dedicado à leitura desse trabalho, bem como por contribuírem para o enriquecimento da dissertação. À CAPES e à UFPR, agradeço o apoio financeiro e institucional para realização desse projeto.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, com meu aprendizado e com o desenvolvimento desse projeto de pesquisa. Sou eternamente grata pela oportunidade de aprender e fazer ciência.



## RESUMO

Entende-se por câncer o conjunto abrangente de mais de 100 doenças, cujas características em comum são a proliferação celular descontrolada e a invasão de tecidos. Os mecanismos e características desenvolvidos durante a formação do câncer são descritos como *Hallmarks of Cancer*, e um dos maiores desafios na Oncologia é o fenômeno conhecido como *Multidrug Resistance* (MDR). A MDR no câncer é ocasionada principalmente pelos transportadores ABC, proteínas transmembrana que realizam o efluxo de quimioterápicos para o meio extracelular, sendo o ABCG2 um dos seus principais agentes. Uma estratégia para superar a MDR causada pelo ABCG2 é a utilização de inibidores específicos, como a Cromona 4a um potente inibidor capaz de restaurar a sensibilidade de células resistentes à quimioterapia. Enquanto a caracterização do mecanismo bioquímico e molecular desse inibidor já foi estudada em modelos *in vitro* e *in silico*, sua validação em modelos mais complexos, como modelos *in vivo*, nunca foi explorada. Assim, este estudo estabeleceu uma linhagem celular murina, B16F10MX2.5C9S4, superexpressando ABCG2 por meio da exposição à mitoxantrona. Além disso, foi testado e validado um modelo de inoculação de células B16F10 na veia caudal de camundongos BL67C/6, resultando na formação consistente de tumores metastáticos no pulmão. Ademais, um modelo utilizando a membrana corioalantoide (CAM) de ovos de galinha fertilizados foi estabelecido a partir da inoculação de células humanas que superexpressam ABCG2, resultando na formação de tumores primários sobre a CAM. Futuros estudos empregarão esses modelos para avaliar a eficácia da Cromona 4a em combinação com quimioterápicos substratos de ABCG2, como mitoxantrona.

Palavras-chave: Resistência múltipla a drogas (MDR), transportadores ABC, ABCG2, inibidores de ABCG2, Cromona 4a, B16F10, metástase pulmonar experimental, membrana corioalantoide.



## ABSTRACT

Cancer comprises a large group of more than 100 diseases characterized by uncontrolled cell proliferation and possible tissue invasion. The capabilities acquired during the development of cancer are known as Hallmarks of Cancer, and a major therapeutic challenge in oncology is multidrug resistance (MDR). The MDR in cancer is mainly caused by the ABC transporters, proteins that pump chemotherapeutic drugs out of the cell, with ABCG2 being a prominent player. One strategy to overcome ABCG2-mediated MDR involves the use of specific inhibitors, such as chromone 4a, a potent ABCG2 inhibitor that restores chemosensitivity of resistant cancer cells. While the biochemical and molecular mechanisms of chromone 4a have been characterized in *in vitro* and *in silico* models, its validation in more complex *in vivo* models remains unexplored. This study established a murine melanoma cell line, B16F10MX2.5C9S4, overexpressing ABCG2 through clonal selection with mitoxantrone exposure. Furthermore, it was tested and validated the inoculation of B16F10 cells via caudal vein injection into BL67C/6 mice, resulting in consistent lung metastatic tumor formation. In addition, a model using the chorioallantoic membrane (CAM) of fertilized chicken eggs was established by inoculating human cells overexpressing ABCG2, resulting in the formation of primary tumors on the CAM. Future work will employ these models to evaluate the efficacy of Chromone 4a in combination with ABCG2-substrate chemotherapeutic agents, such as mitoxantrone.

**Keywords:** Multidrug Resistance (MDR), ABC transporters, ABCG2, ABCG2 inhibitors, Chromone 4a, B16F10, experimental pulmonary metastasis, chorioallantoic membrane (CAM).

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – OS 10 PRINCIPAIS TIPOS DE CÂNCER COM MAIOR INCIDÊNCIA E LETALIDADE, DIVIDIDOS POR SEXO, NOS ESTADOS UNIDOS.....	17
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO CELULAR E TECIDUAL DOS TRANSPORTADORES ABC EM HUMANOS.....	20
FIGURA 3 – ESTRUTURA TRIDIMENCIONAL DOS TRANSPORTADORES ABCB1, ABCC1 E ABCG2.....	21
FIGURA 4 – CICLO DE TRANSPORTE DOS TRANSPORTADORES ABC.....	21
FIGURA 5 – MECANISMO DE EFLUXO DO TRANSPORTADOR ABCG2.....	22
FIGURA 6 – SUBSTRATOS TRANSPORTADOS POR ABCB1, ABCC1 E ABCG2.....	25
FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DO MBL-II-141 E CROMONA 4ª.....	28
FIGURA 8 – DESENVOLVIMENTO DE TUMOR PRIMÁRIO E METÁSTASE NO EMBRIÃO.....	30
FIGURA 9 – MODELO DE CONTENÇÃO E INOCULAÇÃO ANIMAL.....	38
FIGURA 10 – CURVA DE CITOTOXICIDADE DE MITOXANTRONA EM CÉLULAS B16F10.....	41
FIGURA 11 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA - SEMANA 1.....	42
FIGURA 12 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS APÓS 1 SEMANA DE PRESSÃO.....	43
FIGURA 13 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA - SEMANA 2.....	44
FIGURA 14 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA - SEMANA 3.....	46
FIGURA 15 – DEMARCAÇÃO DE CLONES DE B16F10 PARA EXPANSÃO E FUTURA EXPOSIÇÃO AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.....	48
FIGURA 16 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA DOS CLONES C7, C9 E 13 – SEMANA 1.....	49
FIGURA 17 – MORFOLOGIA DOS CLONES 7 E 9 DE B16F10 APÓS EXPOSIÇÃO POR 1 SEMANA COM MITOXANTRONA.....	50
FIGURA 18 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA DOS CLONES C7, C9 E 13 – SEMANA 3.....	52
FIGURA 19 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA DO CLONE 9 – SEMANA 4.....	54
FIGURA 20 – EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>Abcb1</i> , <i>Abcc1</i> E <i>Abcg2</i> DOS CLONES C7, C9 E C13 .....	56
FIGURA 21 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA DO CLONE 9 POR 1 SEMANA APÓS DESCONGELAMENTO.....	58
FIGURA 22 – FOCOS DE METÁSTASE EM CAMUNDONGOS C67BL/6.....	60
FIGURA 23 –DESENVOLVIMENTO DE MASSAS TUMORAIS APÓS INOCULACAO DE CÉLULAS HEK293-ABCG2 E H460MX20, NA CAM.....	63

FIGURA 24 – ESQUEMA DE INOCULACAO DO MODELO DE METÁSTASE EM CAMUNDONGOS C57BL/6.....	65
FIGURA 25 – ESQUEMA DE TRATAMENTO DO MODELO DE METÁSTASE EM CAMUNDONGOS C57BL/6.....	66

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS.....	33
TABELA 2 – PRIMERS MURINOS UTILIZADOS.....	37
TABELA 3 – MEDIANAS DE FLUORESCÊNCIA E ÍNDICE DE RESISTÊNCIA DA EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA.....	47
TABELA 4 – MEDIANAS DE FLUORESCÊNCIA E ÍNDICE DE RESISTÊNCIA DA EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA – SEMANA 1.....	48
TABELA 5 – MEDIANAS DE FLUORESCÊNCIA E ÍNDICE DE RESISTÊNCIA DA EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA – SEMANA 3.....	51
TABELA 6 – MEDIANAS DE FLUORESCÊNCIA E ÍNDICE DE RESISTÊNCIA DA EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA – SEMANA 4.....	53
TABELA 7 – MEDIANAS DE FLUORESCÊNCIA E ÍNDICE DE RESISTÊNCIA DA EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA APÓS DESCONGELAMENTO.....	57
TABELA 8 – LINHAGENS CELULARES TESTADAS NA MEMBRANA CORIOALANTOIDE.....	61

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1 CÂNCER.....	16
2.2 <i>Multidrug Resistance</i> (MDR).....	18
2.3 TRANSPORTADORES ABC.....	19
2.3.1 TRANSPORTADOR ABCB1.....	22
2.3.2 TRANSPORTADOR ABCC1.....	23
2.4 TRANSPORTADOR ABCG2.....	23
2.4.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS.....	24
2.4.2 SUBSTRATOS DO TRANSPORTADOR ABCG2.....	25
2.4.3 USO DE INIBIDORES.....	26
2.4.4 MBL-II-141 (CROMONA6g) e CROMONA 4a.....	27
2.5 MODELOS DE TUMOR <i>IN VIVO</i> .....	28
2.5.1 MODELOS DE METÁSTASE <i>IN VIVO</i> .....	29
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>31</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>5. METODOLOGIA .....</b>	<b>32</b>
5.1 CULTIVO CELULAR .....	33
5.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT .....	33
5.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA POR EXPOSIÇÃO CONTÍNUA À MITOXANTRONA.....	34
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO TRANSPORTADOR ABCG2 POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	34
5.5 PREPARAÇÃO DE PELLETS CELULARES PARA AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO FENOTÍPICA .....	35
5.6 EXTRAÇÃO DO RNA PARA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA .....	36
5.7 SELEÇÃO DE CLONES DE B16F10 PARA ESTABELECEER UMA LINHAGEM SUPEREXPRESSANDO <i>Abcg2</i> .....	37

5.8	MODELOS DE METÁSTASE <i>in vivo</i> EM CAMUNDONGOS C57BL/6.....	38
5.9	MODELO DE MEMBRANA CORIOALANTOIDE .....	39
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
6.1	OBTENÇÃO DA LINHAGEM B16F10 RESISTENTE A MITOXANTRONA.....	40
6.2	OBTENÇÃO DE CLONES DE CÉLULAS B16F10 SELECIONADOS PELA EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA.....	47
6.3	MODELO DE METÁSTASE <i>in vivo</i> (PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO) .....	59
6.4	MODELOS DE MEMBRANA CORIOALANTOIDE (PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO).....	60
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>65</b>
8.1	ENSAIOS <i>in vivo</i> DE METÁSTASE COM A CROMONA 4a .....	65
8.2	TESTES NA MEMBRANA CORIOALANTOIDE COM INIBIDORES .....	66
8.3	ESTABELECIMENTO DE UM MODELO DE METÁSTASE NA MEMBRANA CORIOALANTOIDE.....	67
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma patologia multifatorial, podendo ser resultado de uma série de fatores ambientais, comportamentais e genéticos. Atualmente o câncer é considerada a segunda principal causa de morte no mundo (OMS, 2020). O desenvolvimento de neoplasias ocorre devido à proliferação descontrolada de células, normalmente apresentando um acúmulo de mutações genéticas. Em muitos casos, essas células neoplásicas perdem características estruturais originais e se tornam capazes de evadir-se do sistema imune e invadir tecidos adjacentes (Zhang et al., 2024).

O conjunto de características adquiridas por células neoplásicas, essencial para formação de tumores malignos foi descrito como *Hallmarks of Cancer* (Hanahan, 2022). Uma consequência do conjunto desses atributos, como instabilidade genômica, adaptação metabólica, sinalização proliferativa e resistência da morte celular, está diretamente relacionado com o desenvolvimento de mecanismos de resistência aos tratamentos quimioterápicos (Holohan et al., 2013).

Os mecanismos de *multidrug resistance* (MDR) são estratégias que as células neoplásicas desenvolvem para evadir a ação dos agentes antineoplásicos que induzem morte celular, contribuindo para o avanço da doença e consequentemente aumentando as taxas de mortalidade. Dentre os mecanismos celulares de MDR, o principal é o aumento do efluxo de fármacos, mediada pelos transportadores ABC (Duan et al., 2023). Os transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) são proteínas transmembrana localizadas em diversos tecidos e barreiras fisiológicas e que apresentam papéis essenciais no transporte de xenobióticos. Porém, essas proteínas são também capazes de transportar uma grande diversidade de medicamentos, como quimioterápicos. Desse modo, células neoplásicas resistentes apresentam níveis elevados desses transportadores, aumentando o efluxo de antineoplásicos para o meio extracelular e consequentemente reduzindo os níveis intracelulares para concentrações subclínicas (George, 2023).

Dentre os transportadores ABC relacionados com a MDR pode-se destacar a importância do ABCG2, localizado em barreiras fisiológicas, como a placenta e a barreira hematoencefálica, e órgãos como fígado, testículos, rins e intestino (Robey et al., 2009). Apesar de sua importância em células normais em processos de



detoxificação, observa-se uma superexpressão do transportador ABCG2 em diferentes neoplasias, incluindo leucemias, câncer de pâncreas e colorretal (Marques et al., 2025). Essa superexpressão, em neoplasias, está diretamente relacionada com a falha dos protocolos clínicos. Desse modo, uma maneira de contornar esse mecanismo de MDR e restaurar a sensibilidade da célula neoplásica ao tratamento oncológico se dá a partir do uso de inibidores específicos (Lecerf-Schmidt et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa identificou e caracterizou o mecanismo de inibição de diferentes inibidores de ABCG2, incluindo a cromona 4a. Esse inibidor é específico para ABCG2 e não citotóxico, sendo um candidato promissor para modelos *in vivo* e, futuramente, uma alternativa para testes clínicos em pacientes oncológicos (Pires et al., 2016; Zattoni et al 2022; Valdameri et al., 2023). Nesse estudo, foi estabelecida uma linhagem celular de melanoma murino, por meio da exposição à quimioterapia, no intuito de mimetizar a MDR mediada pelo transportador ABCG2. Adicionalmente, foram padronizadas abordagens de estudo em modelos *in vivo*, incluindo um modelo de metástase em camundongos C57BL/6 e um ensaio de desenvolvimento de tumor primário na membrana corioalantoide, ambos para futuramente validar o uso do inibidor Cromona 4a em células que superexpressam ABCG2.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

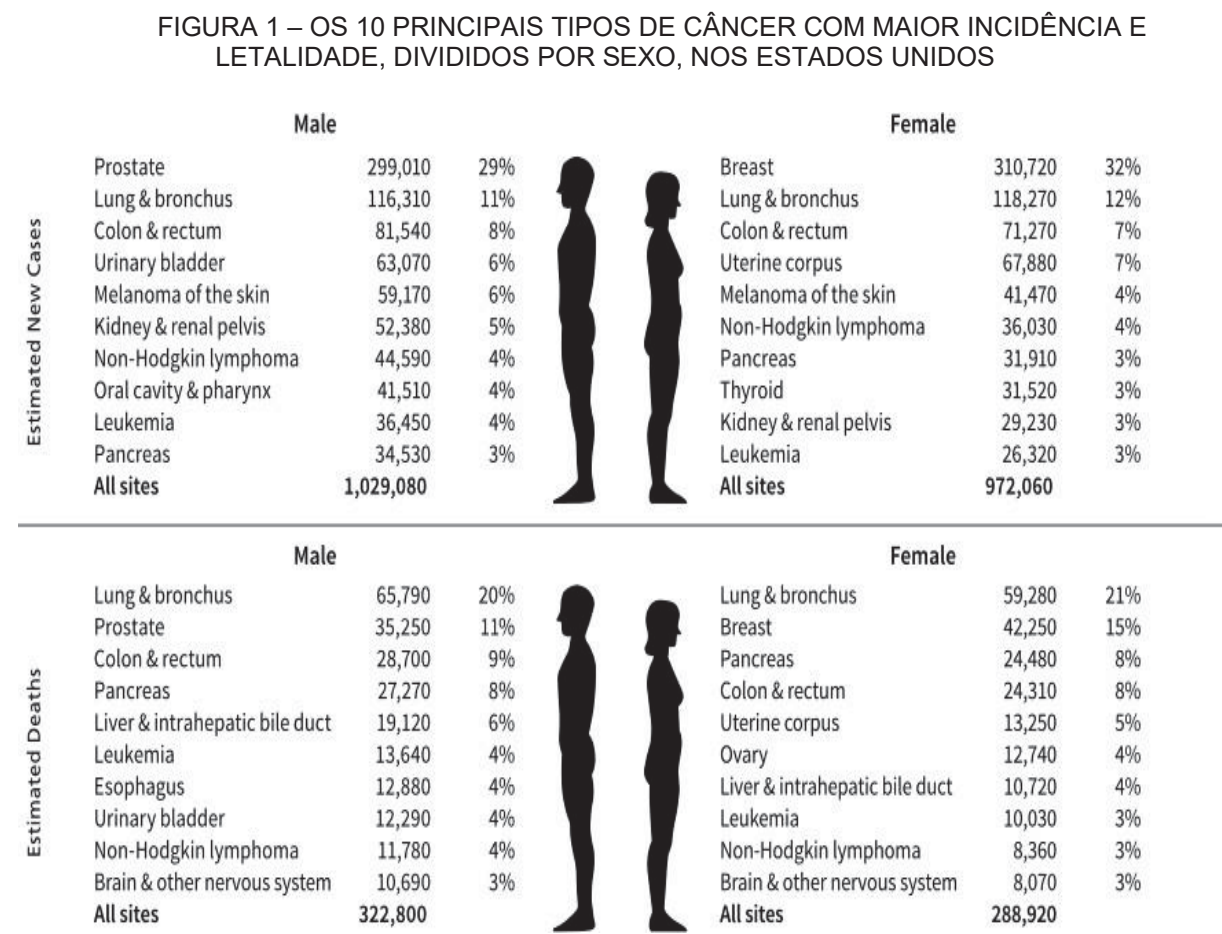
### **2.1 CÂNCER**

Câncer é o nome utilizado para identificar um conjunto abrangente de mais de 100 doenças, cuja característica em comum é o crescimento, desenvolvimento e proliferação desordenada de células. Denominado como oncogênese ou carcinogênese, esse ciclo anômalo enseja que células cancerígenas cresçam e se proliferem de maneira incontrolável, podendo, assim, invadir outros tecidos do organismo (INCA, 2020).

Cabe ressaltar que na oncogênese, os genes sofrem a ação de agentes iniciadores (carcinógenos), como a radiação solar ou compostos químicos como benzeno, gerando mutações e a ativação de proto-oncogenes. A proliferação dessas

células transformadas é estimulada pela ação de agentes promotores, como hormônios ou inflamação crônica. Com a progressão do tumor, o acúmulo de mutações genéticas e modificações do microambiente fazem com que o organismo perca sua capacidade de suprimir o tumor e torna-se um ambiente favorável ao desenvolvimento do câncer (Zhang et al., 2024).

Siegel et al. (2024) sugerem que o câncer é a principal causa de morte entre pessoas com menos de 85 anos nos Estados Unidos. Ademais, afirmam que, no mesmo país, em 2024, a *American Cancer Society* estimou que ocorreram 2 milhões de novos casos e 611.720 novas mortes ocasionadas pela doença. Ainda segundo a mesma pesquisa, dentre os tumores malignos, os mais frequentes, estatisticamente, são o câncer de próstata no homem e o de mama na mulher. Já no que se refere à letalidade, para ambos os sexos, os maiores índices são para câncer de pulmão e de brônquios (FIGURA 1).



FONTE: Siegel RL et al., 2024. Licenciado sob CC BY-NC-ND  
(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Já no contexto do Brasil, para o triênio 2023-2025, estimam-se 704 mil novos casos da doença, sendo os principais, e excluindo o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama feminina (73 mil novos casos) e o câncer de próstata (71 mil novos casos) (Santos et al. 2023).

De acordo com Hanahan e Weinberg, o desenvolvimento de neoplasias está relacionado com um conjunto de características específicas e anormais, que distinguem tumores malignos de células normais do organismo, conhecidas como *Hallmarks of Cancer*. Em 2000, os 6 primeiros mecanismos e características típicas de células neoplásicas foram descritas, sendo eles: sustentação de sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, resistência a morte celular, imortalidade replicativa, promoção de angiogênese e ativação da invasão e metástase (Hanahan; Weinberg, 2000). Esses mecanismos foram complementados pelos mesmos pesquisadores em 2011, com mais duas características emergentes: a desregulação do metabolismo energético e a evasão do sistema imunológico; e dois facilitadores: a instabilidade genômica e mutação e a inflamação tumoral (Hanahan; Weinberg, 2011). Já em 2022, Hanahan publicou mais 4 novos avanços nas características tumorais: plasticidade fenotípica (alteração do fenótipo), microambiente tumoral, influência do microbioma e senescência tumoral. Desse modo, atualmente são descritos 14 marcadores e características de células tumorais (*Hallmarks of Cancer*), que em última instância aumentam a letalidade a doença (Hanahan, 2022).

Durante o processo em que as células adquirem progressivamente características denominadas *Hallmarks of cancer*, um fator agravante é a contribuição da MDR mediada pelos transportadores ABC. Esses transportadores também apresentam papéis na oncogênese, promovendo ou interferindo em propriedades como a sinalização proliferativa e a resistência à morte celular (Duvivier et al., 2024).

## 2.2 Multidrug Resistance (MDR)

No contexto do tratamento oncológico, um dos principais focos das pesquisas relacionadas à resistência a medicamentos é a resistência celular, diretamente relacionada a fatores genéticos ou até mesmo induzida pela própria quimioterapia. Esse mecanismo de células neoplásicas é conhecido como *Multidrug Resistance* (MDR) (Luqmani, 2005). A MDR está correlacionada com um aumento de 90% da letalidade da doença, principalmente nos casos de metástase (Bukowski; Kciuk; Kontek, 2020). Dentre os mecanismos de MDR, pode-se citar o aumento da capacidade de reparo do DNA, evasão do apoptose, ativação de sistemas de desintoxicação e o aumento do efluxo de drogas mediado por transportadores ABC (Gottesman; Fojo; Bates, 2002).

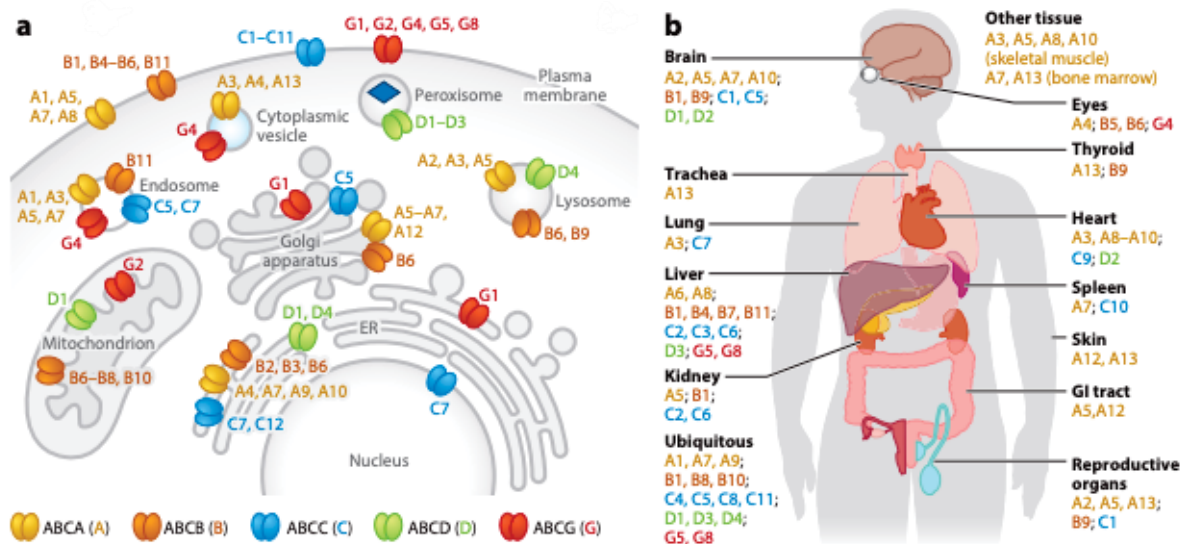
O desenvolvimento de tumores envolve uma série de fatores, como o estabelecimento de um microambiente propício ao crescimento e proliferação de células neoplásicas (Almazrouei et al., 2025). Algumas características se agravam, como a heterogeneidade entre suas células e o efeito de fatores como a hipoxia causada pela oxigenação do tecido, o pH e a matriz extracelular. Esses efeitos em conjunto fazem com que células de um tumor respondam de maneiras distintas ao mesmo tratamento (Senthebane et al., 2017). A resistência é fortemente vinculada à recorrência e metástase, sendo essas as circunstâncias que mais dependem do tratamento quimioterápico, ocasionando, assim, menor sucesso no tratamento e uma maior letalidade (He et al., 2021). Desse modo, um grande desafio no tratamento de pacientes com câncer é o desenvolvimento de MDR, principalmente relacionado à atividade dos transportadores ABC (Duvivier et al., 2024).

### 2.3 TRANSPORTADORES ABC

Os transportadores ABC, também conhecidos como *ATP binding cassette* são proteínas transportadoras formadas por dois domínios transmembrana (TMD) e dois domínios de ligação ao nucleotídeo (NBD) e têm como função a translocação de moléculas pequenas através das membranas celulares (Thomas; Tampé, 2020). Os humanos possuem 48 genes, e um pseudogene, que codificam essas proteínas ABC (Alam; Locher, 2023). Destes, 44 codificam para transportadores, que possuem tanto TMDs quanto NBDs. Esses genes se dividem em sete subfamílias, rotuladas de A à

G, seccionadas por suas características, sequências, organizações gênicas e funções (FIGURA 2).

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO CELULAR E TECIDUAL DOS TRANSPORTADORES ABC EM HUMANOS

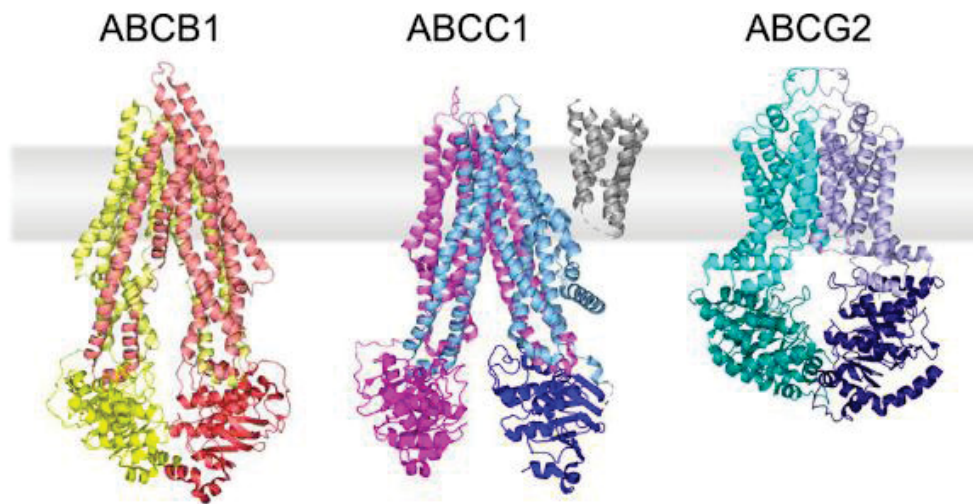


FONTE: (Alam; Locher, 2023) Licença CC BY 4.0.

Alguns destes transportadores ABC apresentados na FIGURA 2 possuem funções essenciais para o equilíbrio da homeostasia de células, atuando na extrusão de substâncias pelas membranas celulares, justificando a expressão em múltiplos órgãos (Alam; Locher, 2023). Contudo, apesar de sua importância em células normais, em casos de neoplasias, os transportadores ABC acabam atuando como bombas de efluxo de quimioterápicos (Fan et al, 2023). Cabe salientar que esses transportadores estão associados a algumas características de células cancerosas como a sustentação da proliferação celular; invasão tecidual e metástase; evasão da morte celular programada, assim como a características de progressão tumoral, como processos inflamatórios (Muriithi et al., 2020).

Dentre os transportadores ABC em questão, os 3 principais responsáveis pela MDR são: ABCB1, ABCC1 e ABCG2 (FIGURA 3) (George, 2023).

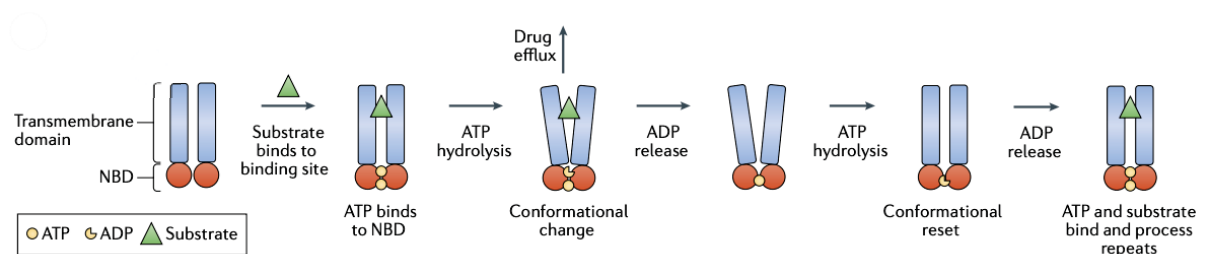
FIGURA 3 – ESTRUTURA TRIDIMENCIONAL DOS TRANSPORTADORES ABCB1, ABCC1 E ABCG2



FONTE: Adaptado de (Baril; Gose; Schuetz, 2023) Licença CC BY 4.0

Estruturalmente, o mecanismo de efluxo dos transportadores ABC é dependente da ligação e hidrólise de ATP (FIGURA 4), caracterizado por mudanças conformacionais do estado voltado ao citoplasma para o meio extracelular. O substrato liga-se nos TMDs, enquanto duas moléculas de ATP se ligam nos NBDs. A hidrólise da primeira molécula de ATP e o efluxo dos substratos ocorre de maneira concomitante, quanto que após a segunda hidrólise de ATP gera uma mudança conformacional para a estrutura voltar a forma nativa (Robey et al., 2018)

FIGURA 4 – CICLO DE TRANSPORTE DOS TRANSPORTADORES ABC



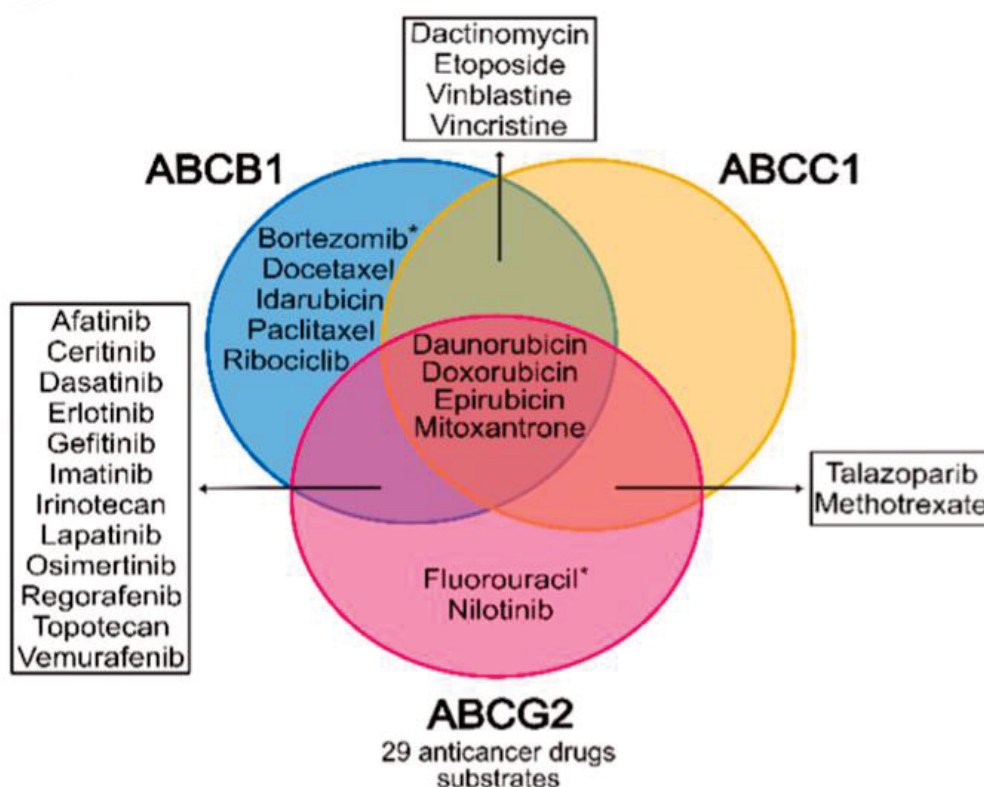
FONTE: Adaptado de Robey, 2018

Um dos agravantes no processo de MDR mediado pelos transportadores ABC é a capacidade de transportar muitos substratos sem correlação química



estrutural. Essa particularidade faz com que os transportadores ABCB1, ABCC1 e ABCG2 apresentem sobreposição de substratos quimioterápicos transportados. Como apresentado na FIGURA 5, quatro importantes quimioterápicos utilizados em protocolos de diferentes tipos de câncer são substratos destes e transportadores ABC (Marques et al., 2025).

FIGURA 5 – SUBSTRATOS TRANSPORTADOS POR ABCB1, ABCC1 E ABCG2



FONTE: Adaptado de Marques et al., 2025

### 2.3.1 TRANSPORTADOR ABCB1

ABCB1, também conhecido como MDR1 ou Glicoproteína P (P-gp), foi o primeiro transportador ABC descrito. P-gp foi descoberta em células de ovário de hamsters chineses resistentes ao agente citotóxico colchicina, conhecido desde então como um clássico substrato desta proteína (Juliano; Ling, 1976). A P-gp é encontrada em tecidos epiteliais em todo o organismo, tais como placentário, renal, hepático, intestinal, ovários, testículos e glândulas, além de compor a membrana luminal dos



vasos da barreira hematoencefálica (Fromm, 2004). Apesar de estar presente em tecidos específicos, o mecanismo de resistência em tumores que expressam esses transportadores não necessariamente ocorre apenas em tecidos com expressão intrínseca, pois o tratamento quimioterápico comumente induz a expressão de transportadores como uma forma adaptativa da célula, que constitui a resistência adquirida (Pilotto Heming et al., 2022).

### 2.3.2 TRANSPORTADOR ABCC1

O segundo transportador descoberto em humanos foi o ABCC1, também conhecido como MRP1 (*Multidrug Resistance-associated Protein 1*), reportado em células de câncer de pulmão humano, conhecidas como H69AR, resistentes a doxorrubicina. Essa linhagem H69AR superexpressa MRP1 quando comparada com células da mesma linhagem sensíveis aos quimioterápicos (Cole et al., 1992). MRP1 também apresenta importante papel no transporte de moléculas em importantes barreiras farmacológicas como intestino, pele, rins e músculo esquelético e atua no transporte de glutatona e seus conjugados, que atuam na defesa das células contra espécies reativas de oxigênio (Wijnholds et al., 1997).

### 2.4 TRANSPORTADOR ABCG2

O terceiro transportador ABC identificado como responsável pela MDR foi o ABCG2, também conhecido como BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*), MXR (*Mitoxantrone Resistance Protein*) ou ABCP (*Placenta Specific ABC Transporter*) (Doyle et al., 1998; Allikmets et al., 1998; Miyake et al., 1999). Além dos altos níveis de expressão no tecido mamário e placentário, ABCG2 também é encontrado no fígado, intestino, endotélios e veias (Ejendal; Hrycyna, 2002).

O transportador ABCG2 foi descoberto simultaneamente em três laboratórios independentes. O primeiro grupo identificou a proteína em células de câncer de mama humano MCF-7/AdrVp, nomeando-a como BCRP (Doyle et al., 1998). Outros dois grupos que identificaram o mesmo gene nomearam de maneira diferente: ABCP por sua alta expressão na placenta (Allikmets et al., 1998) e MXR pela superexpressão

em células de carcinoma de cólon S1-M1-80 resistentes a mitoxantrona (Miyake et al., 1999).

#### 2.4.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS

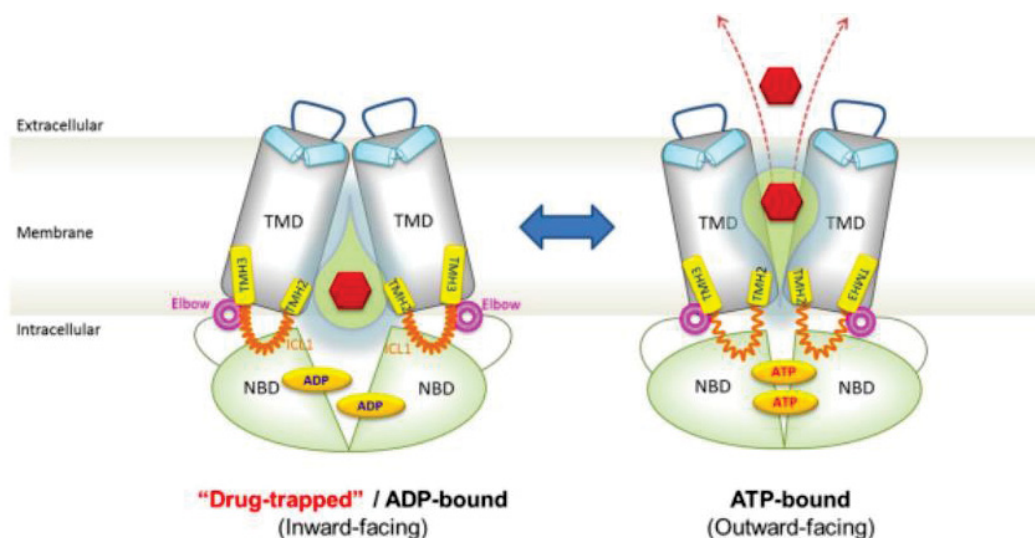
O ABCG2 é localizado no braço longo do cromossomo 4 entre as bandas 21 e 22 e tem extensão de mais de 66kb, composto por 16 éxons e 15 íntrons (Bailey-Dell et al., 2001). Ao ser transcrito, forma uma proteína de 72 kDa e composta por 665 aminoácidos (Robey et al., 2009). Estruturalmente, ABCG2 é considerado um “meio-transportador”, visto que apresenta apenas 1 TMD localizado na porção C-terminal e 1 NBD na região N-terminal. Dessa forma, entende-se que para o funcionamento como transportador, ABCG2 precisa se dimerizar formando um transportador completo e funcional, com 2 TMDs e 2 NBDs (Özvegy et al., 2001).

Os TMDs de ABCG2 são compostos por 6 hélices transmembrana conectadas por *loops*. Devido a conformação estrutural do transportador, o *loop* mais importante é o TM5-TM6, conhecido como terceiro *loop* extracelular, responsável pela formação de pontes dissulfeto (Cys592 e Cys608) envolvidas na estrutura final do transportador (Xu et al., 2007).

Os NBDs são formados por motivos conservados e organizados conforme proximidade ao N-terminal. O ATP liga-se no sítio catalítico da proteína localizado na interface entre os dois NBDs dimerizados, entre motivo Walker A e o assinatura ABC, enquanto o Walker B coordena a interação de íons  $Mg^{2+}$  com uma molécula de água, que ao ser polarizada, causa o ataque nucleofílico ao fosfato  $\gamma$  do ATP, gerando sua hidrólise (com a ajuda de H-loops, D-loops e Q-loops) (Álvarez-Fernández et al., 2025).

Como apresentado na FIGURA 6, a ligação e hidrólise de ATP é responsável pela mudança conformacional na estrutura do transportador, que na sua ausência encontra-se na conformação “fechada” (*inward-facing*), com suas hélices centrais criando uma primeira cavidade para ligação de substrato (Khunweeraphong; Stockner; Kuchler, 2017). Quando uma molécula de ATP é hidrolisada, os dímeros sofrem uma mudança conformacional, direcionando sua abertura para o exterior da célula (*outward-facing*) e promovendo o efluxo do substrato. Após a hidrólise de uma segunda moléculas de ATP, a estrutura do transportador retorna ao seu estado basal (Gyöngy et al., 2023).

FIGURA 6 – MECANISMO DE EFLUXO DO TRANSPORTADOR ABCG2



FONTE: (Khunweeraphong; Stockner; Kuchler, 2017) Licenciado sob CC BY 4.0

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

A separação entre suas cavidades também exerce papel no mecanismo de efluxo, visto que substratos se ligam à cavidade central (cavidade 1) em seu estado voltado ao lado intracelular, enquanto a cavidade 2, localizada na parte mais externa dos TMDs, por suas características hidrofóbicas, encontra-se fechada. Quando a mudança conformacional ocorre e o transportador está voltado para o lado extracelular, a alteração da afinidade do substrato pela cavidade 2 atua como um mecanismo para liberação do substrato para o exterior da célula (Taylor et al., 2017).

#### 2.4.2 SUBSTRATOS DO TRANSPORTADOR ABCG2

O ABCG2 tem como substrato diferentes classes de agentes antineoplásicos, como: mitoxantrona, doxorubicina, daunorrubicina, etoposídeo, topotecano, irinotecano, methotrexate, flavopiridol, camptotecina, além uma série de inibidores de tirosina-quinase (TKIs), como imatinibe, gefitinibe, erlotinibe, sunitinibe e lapatinibe. (Marques et al., 2025). Dentre estes substratos, podemos destacar a mitoxantrona, que é um antineoplásico da classe dos inibidores da topoisomerase II, que impede a replicação do DNA e causa consequentemente a morte celular. Esse quimioterápico é utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, como o de próstata, leucemias e linfomas

(Evison et al., 2016). Esse fármaco é substrato dos transportadores ABCB1, ABCC1 e ABCG2, porém estudos demonstraram que células expostas a concentrações escalonadas de mitoxantrona tendem a superexpressar apenas o transportador ABCG2 (Knutsen et al., 2000).

A doxorubicina é um fármaco da classe das antraciclinas, análogo da daunorrubicina e muito utilizada no tratamento de tumores como sarcomas, leucemias, câncer de mama e ovário (Knutsen et al., 2000). Similarmente a mitoxantrona, a doxorubicina é substrato dos 3 principais transportadores relacionados a MDR. Esse medicamento também é usado na pesquisa para causar superexpressão de ABCG2 em linhagens celulares de câncer de mama, ovário e cólon (Calcagno et al., 2008). Outro exemplo de substrato de ABCG2 é o irinotecano, uma pró-droga derivada da camptotecina pertencente à classe dos inibidores da topoisomerase I, utilizada principalmente no tratamento de tumores sólidos. O fármaco necessita de uma conversão enzimática para se converter em seu metabólito ativo, o SN38 (Bailly, 2019). Suas formas pró-droga e ativa são considerados substratos de ABCG2 (Yang et al., 1995) e ABCC1 (Du et al., 2023).

O ABCG2 apresenta também substratos específicos, como o alopurinol, utilizado no tratamento de hiperuricemias, como a gota (Roberts et al., 2017), o flavopiridol, inibidor de quinases dependentes de ciclina e utilizado no tratamento antitumoral (Robey et al., 2001). Apesar de algumas divergências na literatura, o nilotinib e o 5-FU também são considerados substratos específicos de ABCG2 para alguns autores (Marques et al., 2025). O feoforbide *a* é um derivado da clorofila que não apresenta propriedades farmacológicas, mas é utilizado como substrato fluorescente específico de ABCG2 em testes *in vitro* (Robey et al., 2004).

#### 2.4.3 USO DE INIBIDORES

Uma forma de impedir o efluxo de quimioterápicos pelos transportadores é através do uso de inibidores específicos, fazendo com que o fármaco se mantenha dentro da célula e consiga atuar corretamente. A ação desses inibidores pode ocorrer por meio da interação direta com a proteína, no caso de ABCG2, se ligando nos TMDs. A ligação dos inibidores impede a dimerização dos NBDs, bloqueando a estrutura na conformação *inward-facing*, impedindo o efluxo (Álvarez-Fernández et al., 2025).

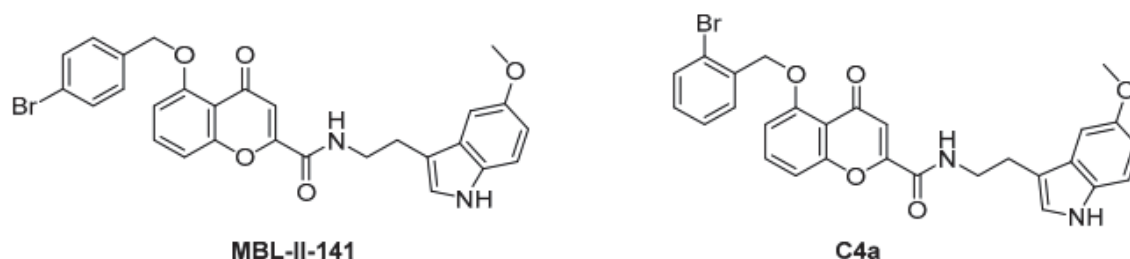
O uso de moléculas que tenham a capacidade de inibir a atividade de transportadores ABC é uma estratégia considerada promissora. O uso de inibidores de transportadores ABC iniciou com testes em P-gp. Ao longo da história, esses inibidores foram melhorando, para se tornar cada vez mais específicos, menos citotóxicos e com mínima interação farmacocinética com quimioterápicos (Zattoni et al., 2022). Para o transportador ABCG2, o primeiro inibidor seletivo descoberto foi a fumitremorgin C (FTC) (Rabindran et al., 1998). Apesar da especificidade alta, o FTC se apresentou tóxico em ensaios *in vivo*, impedindo a realização de estudos adicionais em outros modelos pré-clínicos (Rabindran et al., 1998). Derivados do FTC foram propostos, como o Ko143, um inibidor específico para ABCG2 em baixas concentrações. Apesar de promissor e ser considerado um dos inibidores de referência para ABCG2, o Ko143 também apresentou problemas em modelos animais, como a sua rápida metabolização (Weidner et al., 2015). Assim, a identificação de novos potentes inibidores de ABCG2 com potencial uso clínico continua como um importante desafio (Zattoni et al., 2022).

#### 2.4.4 MBL-II-141 (CROMONA6g) e CROMONA 4a

O grupo de pesquisa *Laboratory of Cancer Drug Resistance* (LCDR) trabalha há décadas na identificação e caracterização de inibidores de ABCG2. Um dos principais inibidores já descritos pelo grupo foi a Cromona 6g (5-(4-bromobenzyloxy)-2-(2-(5-metoxindolil) etil-1-carbonil) -4H-cromen-4-ona), também chamada de MBL-II-141 (FIGURA 7) (Pires et al., 2016). O MBL-II-141 foi patenteado pelo grupo (Valdameri et al., 2012) e seu uso já foi validado em modelo *in vivo* de tumor primário usando animais imunocomprometidos (Honorat et al., 2014).

Através de uma estratégia de síntese racional, a estrutura química do MBL-II-141 foi modificada (posição do bromo) para obtenção da Cromona 4a (FIGURA 7), que se mostrou três vezes mais potente que seu precursor (Pires et al., 2016).

FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DO MBL-II-141 E CROMONA 4A



FONTE: Adaptado de: (Valdameri et al., 2023). Sob licença CC BY 4.0

Mais recentemente, a caracterização do mecanismo de inibição de ABCG2 causado pela Cromona 4a foi realizada através de ensaios *in silico* de docking e dinâmica molecular. Através de ensaios com membranas de células de inseto e ensaios baseados no uso de células humanas, foi observado que a Cromona 4a foi capaz de reverter o processo de resistência celular mediado por ABCG2 (Valdameri et al., 2023). Ainda, diferentes formulações farmacêuticas para esse inibidor já foram validadas, incluindo uma baseada no uso de vesículas humanas circulantes, que foi patenteada pelo nosso grupo de pesquisa (Valdameri et al., 2025). Desse modo, a Cromona 4a possui elevado potencial para futuros ensaios *in vivo*, com o intuito de desenvolver tratamentos mais eficazes para superar a MDR mediada por ABCG2.

## 2.5 MODELOS DE TUMOR *IN VIVO*

Os ensaios *in vivo* são essenciais para os testes de potenciais fármacos, possibilitando analisar toxicidade, metabolização, eficácia e segurança de moléculas promissoras após sua caracterização *in vitro*. No contexto do estudo de tratamentos antineoplásicos, estudos com modelos de tumor primário xenográficos são normalmente utilizados para analisar como o tratamento afeta o desenvolvimento de um tumor específico (Tinhofer; Braunholz; Klinghammer, 2020).

Muitos modelos animais são baseados no uso de linhagens imortalizadas, como a B16F10, uma linhagem celular de melanoma murino proveniente de camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6. Essa linhagem é um subclone da linhagem B16, obtida após injeções intravenosas em camundongos C57BL/6 e recuperada do tumor

pulmonar após repetidos ciclos (trazendo o nome F10). A linhagem B16F10 possui alta capacidade proliferativa e metastática (FIDLER, 1973). Em injeção subcutânea, as células B16F10 são capazes de formar um tumor palpável entre 5 e 10 dias (Overwijk; Restifo, 2001). O modelo tem se demonstrado efetivo na formação de tumores na pele dos flancos, patas e orelha (Potez et al., 2018).

Outro modelo amplamente utilizado no processo de desenvolvimento de novos fármacos é o da membrana coreoalantóide (CAM). A CAM é uma rede rica de vasos interligada diretamente ao embrião por veias e artérias alantóides. É formada entre o dia 4 e 10 de incubação do ovo, pela fusão entre a camada mesodérmica do alantoide e a adjacente do cório. Ela apresenta funções diferentes dependendo do estágio de incubação, partindo de atuar nas trocas gasosas e auxiliando na excreção de ureia e ácido úrico pelo embrião, até trocas de íons como sódio, cloro e cálcio (Ribatti, 2017).

Devido a sua vasta rede de vasos, o estudo da membrana coreoalantóide é frequentemente realizado em pesquisas sobre angiogênese, ou seja, processo de formação de novos vasos sanguíneos dentre os já pré-existentes (Ribatti et al., 2001). Contudo, no contexto do desenvolvimento tumoral, os ensaios em membrana coreoalantóide também são de grande utilidade para avaliar o crescimento celular e metástase. Uma das vantagens do uso da CAM é possibilitar um rápido desenvolvimento da massa tumoral (geralmente de 3 a 4 dias) e apresentar menor custo (Komatsu; Higashi; Matsumoto, 2019). Outro aspecto positivo do uso da CAM é a compatibilidade de testes com diversas linhagens celulares de diferentes espécies, enquanto que ensaios com camundongos se limitam ao uso de linhagens celulares da mesma espécie, exceto no caso de animais imunocomprometidos (Komatsu; Higashi; Matsumoto, 2019).

### 2.5.1 MODELOS DE METÁSTASE *IN VIVO*

Como mencionado anteriormente, o maior desafio do tratamento de pacientes com MDR é no contexto de doença metastática. Os modelos de metástase *in vivo* são utilizados para mimetizar esses casos mais graves da doença, que geralmente demandam o uso de quimioterapia (Karagiannis; Condeelis; Oktay, 2018). Dessa forma, modelos *in vivo* para avaliar tratamentos em situações invasivas de metástase se correlacionam diretamente com a realidade do tratamento e a necessidade de

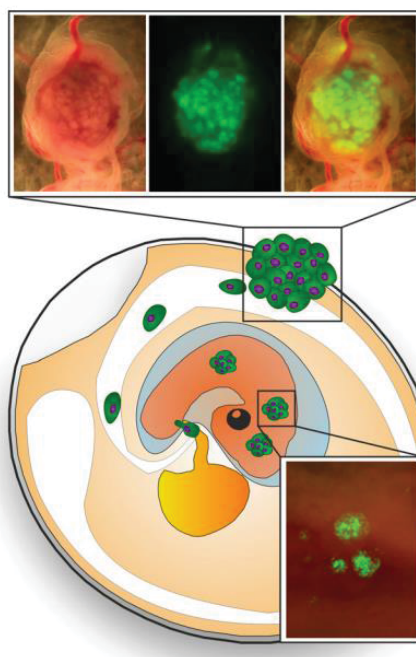


avanços da quimioterapia. Cabe ressaltar que até a presente data, nenhum modelo de metástase foi padronizado para testes com inibidores de transportadores ABC.

Conforme mencionado previamente, modelos de tumor de B16F10 são testados para inoculação subcutânea, gerando um tumor primário no local da injeção. Além desse modelo, devido à alta capacidade metastática da linhagem, torna-se possível o uso por inoculações intravenosas, na veia caudal do animal, onde espera-se metástase pulmonar (Fidler, 1975). Apesar do foco metastático ser preferencialmente pulmonar, a partir da injeção caudal de B16F10, também é possível encontrar desenvolvimentos tumorais em outros órgãos do animal (Brito et al., 2020).

Em relação ao modelo de membrana coreoalantóide, também é interessante para avaliar invasão, migração e desenvolvimento de massas tumorais não apenas na membrana, mas que, pela rica circulação da CAM, se desenvolvam no embrião (FIGURA 8) (Herrmann; Moss; Sée, 2016a). Desse modo, a inoculação de linhagens na CAM pode auxiliar no entendimento do desenvolvimento de micrometástases em diferentes órgãos do embrião, além de avaliar a sobrevivência das células na circulação do animal (Deryugina; Quigley, 2008).

FIGURA 8 – DESENVOLVIMENTO DE TUMOR PRIMÁRIO E METÁSTASE NO EMBRIÃO



FONTE: (Herrmann; Moss; Sée, 2016)

NOTA: Crescimento de tumor primário (imagem superior) e metástase no embrião (imagem inferior) a partir da inoculação de células transduzidas com GFP, permitindo sua identificação por fluorescência.

### 3. JUSTIFICATIVA

Com base no que foi apresentado na contextualização teórica, evidencia-se que a MDR é um dos principais agravantes no desafio do tratamento farmacoterapêutico do câncer. Desse modo, estratégias para contornar a MDR, principalmente causadas pelos transportadores ABC, como ABCG2, são um passo essencial para a melhor eficácia do tratamento quimioterápico.

Dentre os maiores desafios relacionados à doença, está o desenvolvimento de metástase, sendo esse o principal problema clínico associado a MDR. Dessa forma, para estudos relacionados a ineficácia do tratamento ocasionada pelo efluxo de quimioterápicos, realizado pelos transportadores ABC, torna-se de extrema importância o uso de ensaios de formação de tumor metastático.

Nesse contexto, sabe-se que a linhagem B16F10 de melanoma murino é amplamente utilizada em ensaios de metástase *in vivo*. O melanoma é o subtipo mais agressivo dos cânceres de pele, com alta capacidade de desenvolver metástases e de difícil tratamento (Timis et al., 2023). Porém, no que diz respeito a MDR mediada por transportadores ABC, essa linhagem em questão não apresenta superexpressão de Abcg2. Assim, torna-se necessário o estabelecimento de uma linhagem derivada da B16F10 que superexpresse o transportador Abcg2 para futuros testes com o inibidor de escolha, como a Cromona 4a. Além disso, não podemos negligenciar que o principal quimioterápico utilizado para tratamento de melanoma é a dacarbazina (Teimouri; Nikfar; Abdollahi, 2013), que não é substrato de transportadores ABC, incluindo ABCG2. Desse modo, considerando que a mitoxantrona é um quimioterápico amplamente utilizado na exposição de células para induzir um fenótipo de MDR e gerar o aumento da expressão de ABCG2, justifica-se o uso do mesmo para o estabelecimento de uma linhagem resistente para ensaios *in vivo*.

Modelos de formação de tumor *in vivo* são de grande importância no processo de descoberta e validação de novos tratamentos, principalmente para ensaios com compostos promissores *in vitro*, possibilitando testar a metabolização, toxicidade e eficácia. Adicionalmente, modelos como a CAM são estratégias interessantes pelo baixo custo, compatível com diversas linhagens celulares e moléculas descritas como

substratos e inibidores de transportadores ABC. Apesar desse apelo, observa-se que para o transportador ABCG2, pouco foi explorado e descrito na literatura.

Portanto, o presente estudo se justifica pela necessidade do estudo de inibidores de ABCG2 em modelos mais robustos e realísticos, como modelos *in vivo* de metástase, possibilitando o melhor entendimento do uso associativo de inibidores do transportador ABCG2 com quimioterápicos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Estabelecer uma linhagem celular superexpressando ABCG2 e padronizar modelos *in vivo* para estudos de inibidores do transportador ABCG2.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- A partir da linhagem de melanoma murino B16F10, estabelecer uma linhagem superexpressando Abcg2 através da exposição com o quimioterápico mitoxantrona;
- Estabelecer no laboratório um protocolo experimental de metástase pulmonar em camundongos C57BL/6 compatível com a utilização da linhagem B16F10 resistente à mitoxantrona;
- Estabelecer um modelo de CAM para avaliar tumor primário e metástases usando linhagens humanas superexpressando o transportador ABCG2 (HEK293-ABCG2 e H460MX20).

## **5. METODOLOGIA**

## 5.1 CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares utilizadas nesse estudo estão listadas na Tabela 1. Todas as células foram cultivadas em meio com suplementação de 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 0,1% de anfotericina B (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas a 37°C e em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

TABELA 1 – LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS

Nome da linhagem celular	Tipo celular	Meio de cultivo	Características da linhagem
B16F10	Melanoma murino (C57BL/6)	DMEM alta glucose (GIBCO)	Linhagem parental
HEK293-ABCG2	Rim embrionário humano (transfectado)	DMEM alta glucose (GIBCO)	Células transfectas de maneira estável para superexpressar o transportador ABCG2 (Robey et al., 2004)
H460MX20	Carcinoma pulmonar humano (pressionado com mitoxantrona)	RPMI (GIBCO)	Linhagem derivada de células H460 obtida por exposição com mitoxantrona (Zhang et al., 2017)

## 5.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT

O ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) foi realizado como descrito em Mosmann (1983). As células da linhagem B16F10 foram plaqueadas ( $0,5 \cdot 10^4$  células/poço) em uma placa de 96 poços e mantidas em cultivo por 24 horas para adesão. Após esse período, as células foram tratadas com concentrações crescentes de mitoxantrona ( $2 \cdot 10^{-7}$  a  $10 \mu\text{M}$ ) por 72 horas, a faixa de concentração foi estabelecida após ensaios preliminares utilizados exclusivamente para padronização experimental e não incluídos na análise final. Para os ensaios realizados com inibidor de ABCG2, para cada concentração de quimioterápico foram realizadas duplicatas técnicas com e sem a Cromona 4a ( $10$

$\mu\text{M}$ ). Após o tratamento, o meio de cultivo foi descartado e um novo meio com 0,5 mg/mL de MTT foi adicionado. A placa foi incubada por 4 horas à 37 °C. Na sequência, o meio foi descartado com cuidado e os cristais foram solubilizados com DMSO. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas iMark (BioRad) a 595nm. Os dados foram normalizados e transformados em porcentagem de viabilidade celular.

### 5.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA POR EXPOSIÇÃO CONTÍNUA À MITOXANTRONA

Células B16F10 parentais foram submetidas a tripsinização e 20% de confluência foi passada para uma garrafa de cultivo pequena (25 cm<sup>2</sup>). Após as células adquirirem uma confluência de ~50%, a garrafa foi tratada com mitoxantrona (1 a 2,5 nM) e as células foram novamente soltas por tripsina ao adquirirem 90 a 95% de confluência. Esse processo foi realizado conforme a necessidade até a pressão completar 7 dias (totalizando, de modo geral, de 2 a 3 subcultivos), quando as células eram plaqueadas em placas de 24 poços para realização do ensaio de citometria de fluxo e em placas de 96 poços para o ensaio de viabilidade celular. O ciclo de pressão teve duração total de 21 dias, a concentração inicial de 1nM foi estabelecida pela curva de viabilidade celular realizada previamente e foi utilizada apenas durante a primeira semana até a adaptação celular, que levou ao aumento consecutivo da concentração para 2,5 nM pela segunda e terceira semana de exposição. Após os 21 dias foram congelados pellets de células para análises de expressão gênica por RT-qPCR.

### 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO TRANSPORTADOR ABCG2 POR CITOMETRIA DE FLUXO

Foram plaqueadas  $1.10^5$  células/poço (linhagem parental e pressionada com mitoxantrona) em placa de 24 poços. Após 48 horas, as células foram tratadas, obtendo os seguintes grupos/condições: (i) branco (apenas meio de cultivo), (ii) substrato e (iii) substrato + inibidor. Após tratamento, as células foram incubadas por

30 minutos a 37°C. Nos ensaios para o transportador ABCG2, foram utilizados o substrato Mitoxantrona (10 µM) e o inibidor Ko143 (1 µM). Para o transportador ABCB1, foram utilizados o substrato Rhodamina 123 (10 µM) e o inibidor Zosuquidar (1 µM). Por fim, para o transportador ABCC1, foram utilizados o substrato Calceína-AM (0,15 µM) e o inibidor MK-571 (50 µM). Após esse período, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS gelado e a fluorescência intracelular dos substratos foi quantificada por citometria de fluxo (BD FACSCalibur). A diferença entre a fluorescência das células tratadas com substrato + inibidor e das tratadas com substrato sozinho foi chamada de Índice de Resistência Normalizado, calculado conforme a equação:

$$IRN = \frac{CRI - CR}{CPI - CP}$$

em que: *IRN* = Índice de Resistência Normalizado; *CRI* = Célula Resistente com Inibidor; *CR* = Célula Resistente; *CPI* = Célula Parental com Inibidor e *CP* = Célula Parental.

## 5.5 PREPARAÇÃO DE PELLETS CELULARES PARA AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Pellets de célula foram armazenados para extração do RNA e realização da RT-qPCR, para avaliar a expressão gênica dos transportadores ABCB1, ABCC1 e ABCG2. As células foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS gelado e levadas para centrifugação a 2.500 RPM por 5 minutos. Após esse período, foi possível observar o pellet de célula formado no fundo do tubo tipo eppendorf. O sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em um novo PBS e centrifugadas novamente, o processo se repetiu três vezes. Após a lavagem, os pellets foram armazenados em criotubos, na ausência de criopreservantes, em nitrogênio líquido.

## 5.6 EXTRAÇÃO DO RNA PARA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA

Foram adicionados 500 µL de trizol nos tubos contendo os pellets de células. Em seguida os tubos foram centrifugados por 5 min a 12.000xg a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo eppendorf, agitado por 15 segundos e levado para incubação por 5 minutos. Então, foi adicionado 100 µL de clorofórmio e agitado novamente por 15 segundos e incubado por 3 minutos em gelo e centrifugado novamente (15 min/12.000xg/4 °C). Nessa etapa, foi possível visualizar as diferentes fases contendo DNA, RNA e proteínas. A primeira fase (RNA) foi coletada em um novo tubo tipo eppendorf e 250 µL de isopropanolol foi e o tubo centrifugado novamente (10 min/12.000xg/4 °C). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 500 µL de etanol 75%, seguido de mais uma etapa de centrifugação (5 min/7.500xg/4 °C). O processo foi repetido e então o tubo foi deixado para secar sob o fluxo laminar de 5 a 10 minutos para então ser ressuspendido em 20 µL de água comercial livre de RNase. Com o RNA extraído, foi preparado o cDNA utilizando o Kit High-Capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante.

A reação de RT-qPCR foi realizada utilizando primers sintetizados pelo laboratório (TABELA 2), com exceção dos primers para os genes *Abcc1* e *B2m*, que foram gentilmente cedidos pelo laboratório Laboratório de Toxicologia Celular (Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas UFPR). As amostras de cDNA foram diluídas 1:60 (em água comercial livre de RNase). Em cada poço da placa de 96 poços, foram adicionados 1 µL de cDNA, 2 µL dos primers (concentração final de 1 µM) e 3 µL de SybrGreen MasterMix. A placa foi submetida a uma rápida centrifugação (1000 RPM por 2 min) e a RT-PCR foi então realizada no aparelho QIAquant 965plex (Qiagen).



TABELA 2 – PRIMERS MURINOS UTILIZADOS

Gene	NCBI	Sequência 5'-3'	Amplicon
<i>Ppia</i>	NM_008907.2	PF: CAAGACTGAATGGCTGGATGG PR: TTCCTGGACCCAAAACGCTCC	96pb
<i>Hprt1</i>	NM_013556.2	PF: CAGTCCCAGCGTCGTGATTA PR: CACTTTTTCCAAATCCTCGGCA	94pb
<i>Actb</i>	NM_007393.5	PF: CACTGTGAGTCGCGTCC PR: GTCATCCATGGCGAACTGGT	90pb
<i>Abcb1a</i>	NM_011076.3	PF: AAGCGCTTATGCCTGGAAGC PR:CTGTGCCTGGGCTTTCTTGA	93pb
<i>Abcb1b</i>	NM_011075.2	PF: TGAGACAGGATATAAGCTGGT PR: GCGCCCATCGCCCCTTTA	103pb
<i>Abcg2</i>	NM_001355477	PF: GATGCTCTTTTCTGGCCTCTTG PR: TACTGCAAAGCTGTGAAGCCA	105pb

FONTE: A autora, 2025

## 5.7 SELEÇÃO DE CLONES DE B16F10 PARA ESTABELEECER UMA LINHAGEM SUPEREXPRESSANDO *Abcg2*

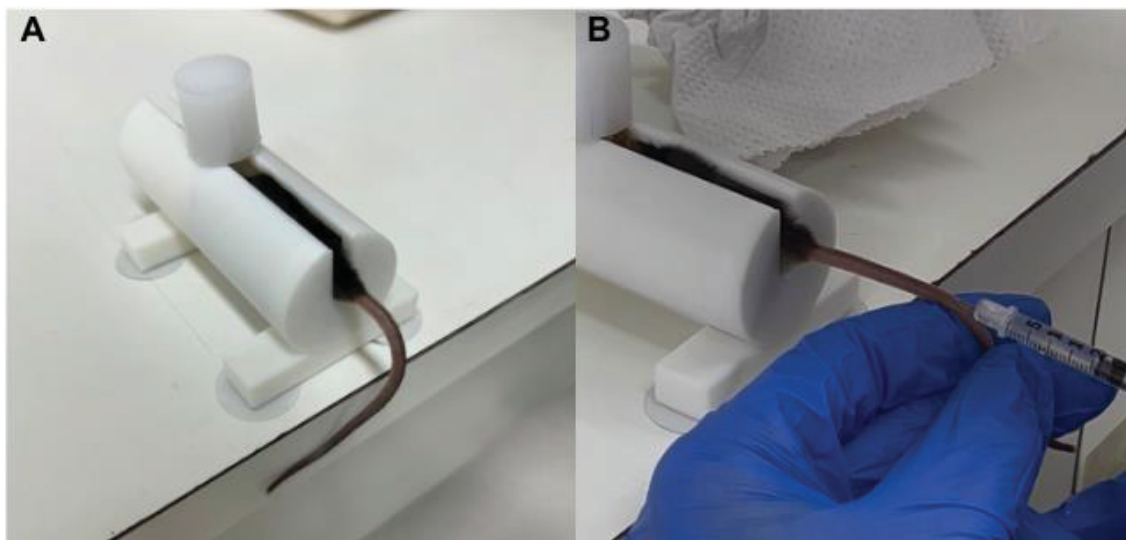
Células da linhagem B16F10 parental foram plaqueadas em placas de 6 poços em baixa confluência (100 a 200 células por poço) e tratadas após 48 horas com 2,5 nM de mitoxantrona. Após 48 horas de exposição ao quimioterápico, pequenos grupos de 3 a 5 células provenientes do mesmo clone e que apresentaram modificações em sua morfologia em comparação à linhagem parental foram demarcados com uma caneta no microscópio (localização na placa). Em seguida, na cabine de segurança, trabalhando com material estéril, discos de metal foram colocados sob a região demarcada previamente e as células foram tripsinizadas e alocadas em placas de 96 poços para crescimento. Ao adquirirem confluência de 90 a 95%, as células foram transferidas para uma placa de 24 poços, ao adquirirem alta confluência novamente, foram novamente submetidas a tripsinização e transferência a uma placa de 6 poços, para que a proliferação celular das linhagens resistentes

fosse adequada. Após esta etapa, as células passaram a receber o tratamento com mitoxantrona a 2,5 nM por 3 semanas consecutivas e realização dos ensaios de efluxo por citometria de fluxo e viabilidade celular.

## 5.8 MODELOS DE METÁSTASE *in vivo* EM CAMUNDONGOS C57BL/6

O projeto foi devidamente aprovado no comitê de ética CEUA/BIO- UFPR (processo nº 23075.045208/2024-65). Para validação da metodologia do desenvolvimento de tumor metastático com foco pulmonar em nosso laboratório, 10 camundongos machos com 6 semanas de vida da linhagem C57BL/6 foram adquiridos do Setor de Criação Animal do LACEA (Fiocruz – Paraná). Para a inoculação,  $1,85 \cdot 10^5$  células B16F10 foram suspensas em 100  $\mu$ L de PBS, mantidas em gelo e inoculadas na veia caudal do animal com seringas de 1 mL (8 mm x 0,30 mm). A contenção do animal foi realizada utilizando um contensor feito em impressora 3D pelo laboratório (FIGURA 9) e a inoculação foi feita por meio de injeção nas veias laterais da cauda do camundongo (FIGURA 9B). Os animais foram eutanasiados após 21 dias por meio de deslocamento cervical.

FIGURA 9 – MODELO DE CONTENSÃO E INOCULAÇÃO ANIMAL



## 5.9 MODELO DE MEMBRANA CORIOALANTOIDE

Para os ensaios da membrana coreoalantoide (CAM) foram utilizadas as linhagens H460MX20 e HEK293-ABCG2, no intuito de comparar o desenvolvimento de um tumor primário de uma linhagem cancerosa e não cancerosa, respectivamente, mas que expressam o transportador ABCG2. Ovos de galinha fertilizados (*Gallus gallus*) foram disponibilizados pelo Prof. Luiz Fernando Pereira do Laboratório de Biologia Experimental, Ciências Biológicas/EMCV, localizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Os experimentos foram iniciados após aprovação no comitê de ética da instituição (CEUA nº 850 E nº 850G). Os ovos foram limpos com água destilada e álcool 70% e colocados em uma incubadora a 37°C e 70% de umidade, considerando esse o início do primeiro dia de incubação. Os ovos foram mantidos em ambiente controlado de temperatura e umidade até o 10º dia de incubação. Neste dia, garrafas de célula das linhagens HEK293-ABCG2 e H460MX20 foram tripsinizadas e  $1 \cdot 10^7$  células foram transferidas para tubos tipo eppendorf e centrifugados por 5 minutos à 2.500 RPM. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio de cultivo específico para cada linhagem, sem suplementação. Gelatina estéril foi preparada utilizando água MiliQ a uma concentração de 85 mg/mL. A gelatina foi pipetada e em seguida o meio de cultivo com células.

No momento da inoculação, uma janela de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> foi aberta na parte ovalada dos ovos. A membrana da casca da câmara de ar foi lavada com algumas gotas de soro fisiológico e em seguida retirada para expor a membrana corioalantoide. Os implantes foram cuidadosamente posicionados sobre a membrana e a janela foi selada com um pedaço de fita estéril Hypafix. Os ovos foram novamente levados para incubação até a eutanásia, que foi realizada no 13º dia, quando a janela foi aberta e exposta para imagens, os embriões foram eutanasiados por meio de resfriamento por submersão de 20 minutos a aproximadamente 4°C, as membranas e os embriões foram armazenados em formol para realizar futuramente os ensaios de imunohistoquímica.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

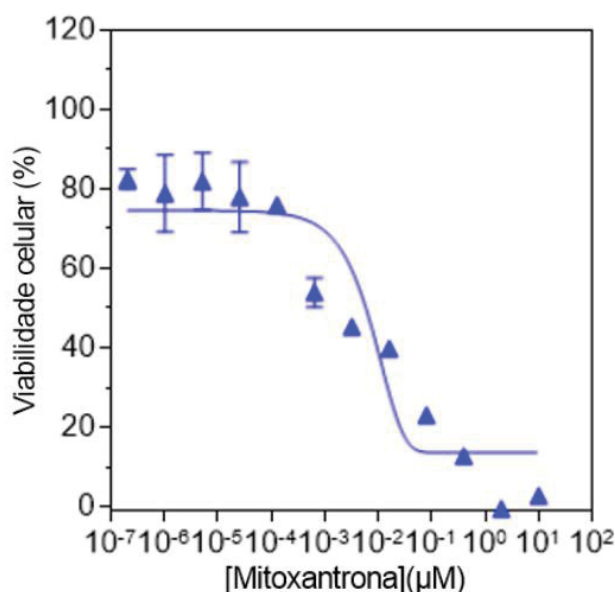
Conforme apresentado na contextualização teórica, o grupo de pesquisa identificou previamente que as cromonas são potentes inibidores de ABCG2. Inicialmente, o MBL-II-141 foi identificado (Valdameri et al., 2012) e seu efeito foi validado em um modelo *in vivo* de tumor xenográfico primário (Honorat et al., 2014). Na sequência um análogo do MBL-II-141, a Cromona 4a, foi identificado (Pires et al., 2016), e teve seu mecanismo de inibição em modelos *in silico* e *in vitro* elucidados (Valdameri et al., 2023). Contudo, para nenhum inibidor do transportador ABCG2, nem mesmo para outros transportadores ABC, o uso foi testado em modelos de metástase, que é o principal problema clínico da MDR. Assim, vislumbrando futuros testes *in vivo* com a Cromona 4a, no atual trabalho buscamos o estabelecimento de linhagens compatíveis com modelos de metástase animal e padronização de ensaios em membrana corioalantoide.

### 6.1 OBTENÇÃO DA LINHAGEM B16F10 RESISTENTE A MITOXANTRONA

Um modelo bem estabelecido e validado de obtenção de focos de metástase é através da inoculação de células de melanoma murino B16F10 na veia caudal de camundongos C57BL/6 (Fidler, 1973). Contudo, a literatura sugere que células de melanoma não expressam o transportador ABCG2 (Chen et al., 2009). Porém, vários autores descrevem que através de um processo de exposição de células com agentes citotóxicos transportados por ABCG2, torna-se possível a obtenção de linhagens resistentes que superexpressam ABCG2, a citar Robey (2001), Calcagno (2008) e Miyake (1999).

Partindo desse pressuposto, células de melanoma murino da linhagem B16F10 foram tratadas com mitoxantrona por 72 horas. Conforme observado na FIGURA 10, a mitoxantrona apresentou um efeito citotóxico significativo em baixas concentrações (faixa de nM). Através da curva de citotoxicidade, pode-se observar que a mitoxantrona apresentou um valor de IG<sub>50</sub> (concentração capaz de reduzir 50% da viabilidade celular) de 16 nM (FIGURA 10).

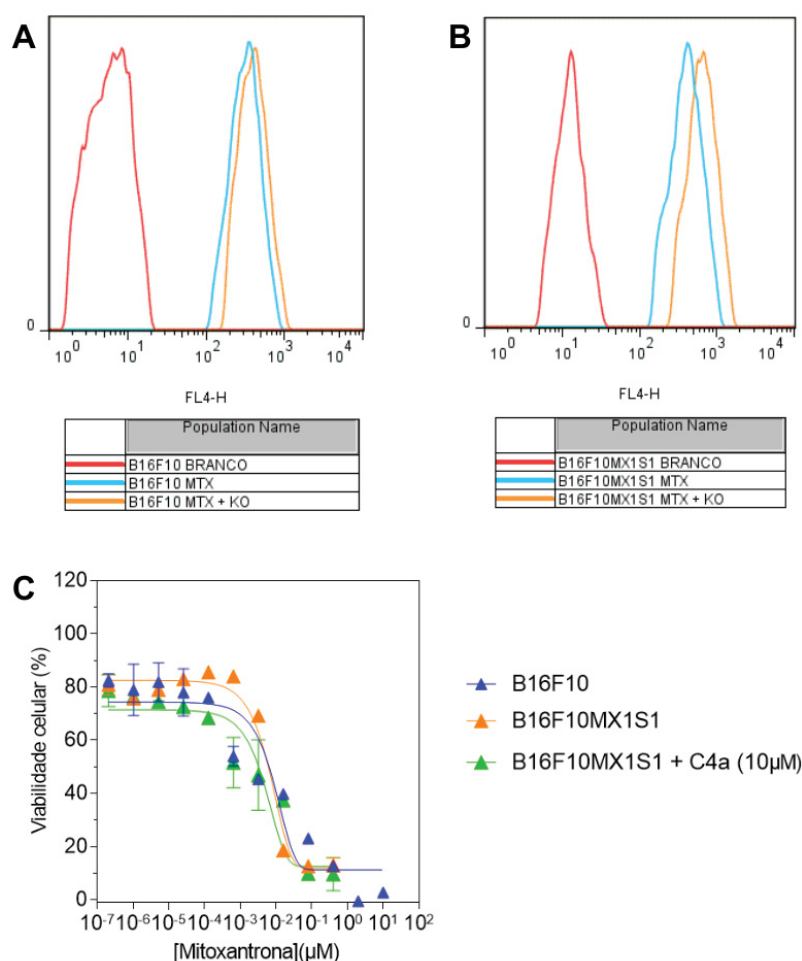
FIGURA 10 – CURVA DE CITOTOXICIDADE DE MITOXANTRONA EM CÉLULAS B16F10



Nota: Efeito citotóxico da mitoxantrona em células B16F10. O ensaio de viabilidade celular foi realizado através do método MTT. Foram plaqueadas  $0,5 \cdot 10^4$  células/poço. Após adesão por 24h foi realizado o tratamento com mitoxantrona ( $2 \cdot 10^{-7}$  a  $10 \mu\text{M}$ ) por um período de 72h. Dados representam a média  $\pm$  SD de dois experimentos independentes.

A partir dos resultados de citotoxicidade da mitoxantrona, a concentração de 1 nM foi escolhida para pressionar as células B16F10. Essa concentração foi escolhida para iniciar a pressão, pois foi capaz de reduzir em aproximadamente 10% da viabilidade celular após 72h de exposição. Assim, as células foram cultivadas e expostas com mitoxantrona como apresentado no item 5.3. Durante os ensaios, outras formas de tratamento foram testadas, a citar: (i) manter todo o tempo a mitoxantrona e (ii) deixar na ausência de mitoxantrona somente para adesão. Essas estratégias não funcionaram e foram muito agressivas para as células, diferente de quando foi aguardado o crescimento celular até atingir 50% confluência da garrafa, situação na qual induziu resistência sem causar uma morte celular expressiva. Desse modo, após a primeira semana de exposição ao quimioterápico, foram realizados o ensaio de efluxo por citometria de fluxo e o ensaio de viabilidade celular (TABELA 3) (FIGURA 11).

FIGURA 11 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA - SEMANA 1



Nota: primeira semana de exposição de células B16F10 com 1 nM de mitoxantrona. O acúmulo intracelular de mitoxantrona em células parentais (B16F10) e pressionadas (B16F10MX1S1) foi realizado por citometria de fluxo. Ko143 1  $\mu\text{M}$  foi usado como inibidor de referência de ABCG2. (A) B16F10 parental. (B) B16F10MX1S1, que corresponde à exposição com 1 nM de mitoxantrona (MX1) por 1 semana (S1). A viabilidade (C) foi determinada pelo método MTT após 72h de exposição com concentrações crescentes de mitoxantrona. Dados representam a média  $\pm$  SD em replicata técnica.

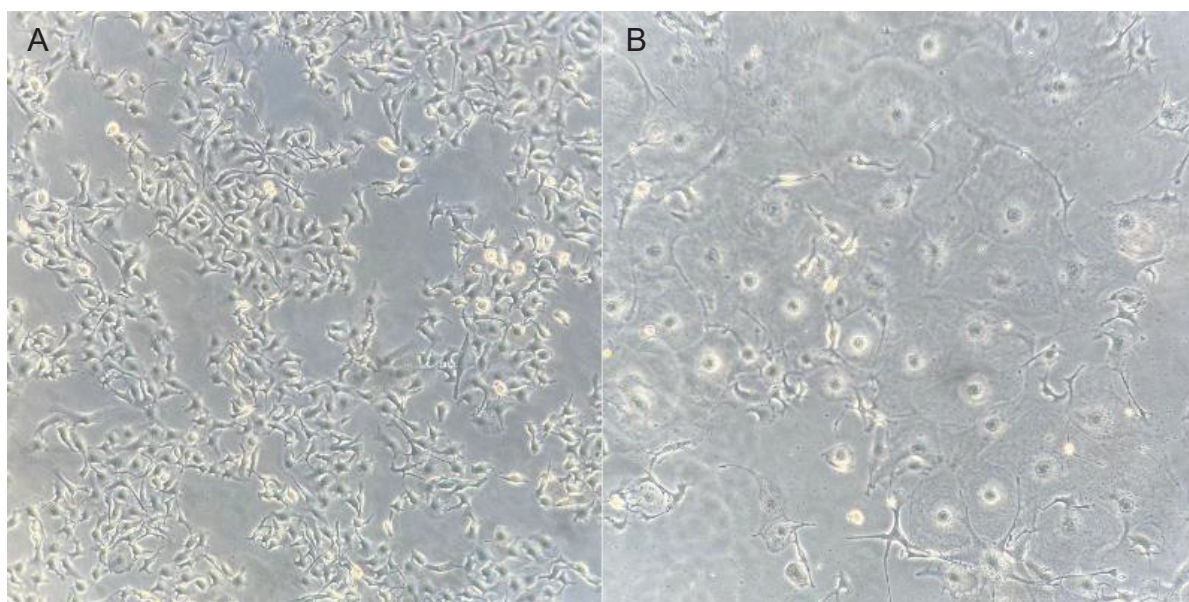
Conforme observado pelos histogramas de citometria de fluxo, comparando as células parentais (B16F10) e as pressionadas por uma semana com mitoxantrona (B16F10MX1S1), o uso do inibidor de referência Ko143 causou um deslocamento referente a um maior acúmulo de mitoxantrona intracelular nas células pressionadas, sugerindo que a pressão com 1 nM com mitoxantrona induz um aumento na expressão de Abcg2 e consequentemente maior efluxo do substrato, nesse caso a própria



mitoxantrona (FIGURA 11A versus 11B). Entretanto, apesar de um possível efluxo detectado por citometria, as curvas de citotoxicidade das células parentais e B16F10MX1S1 são similares, sugerindo que a pressão não gerou um fenótipo de resistência (FIGURA 11C), haja vista que o uso da Cromona 4a em associação com a mitoxantrona não potencializou o efeito citotóxico da mitoxantrona em B16F10MX1S1.

Ainda, após a primeira semana de pressão, pode-se observar uma mudança morfológica significativa entre a linhagem B16F10 e a linhagem pressionada B16F10MX1S1 (FIGURA 12), indicando possivelmente um processo adaptativo da célula ao tratamento quimioterápico.

FIGURA 12 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS APÓS 1 SEMANA DE PRESSÃO

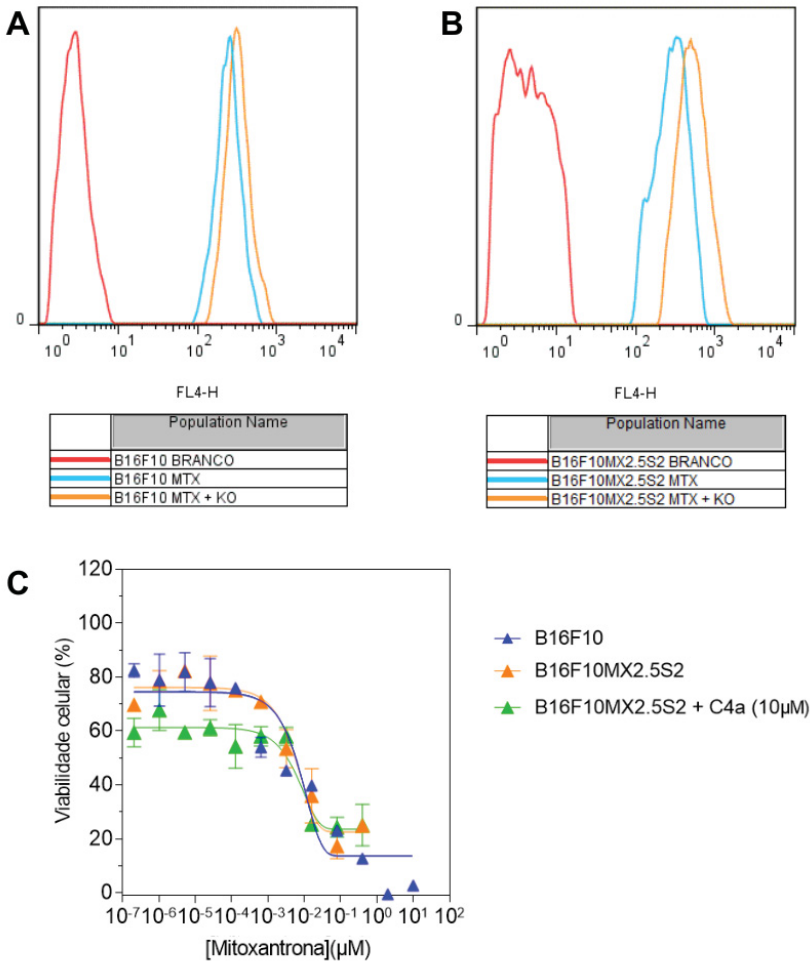


Nota: Imagens obtidas sob aumento de 100x (objetiva 10x/0,22). (A) B16F10 parental, mantida em cultivo paralelamente à linhagem em exposição ao quimioterápico. (B) B16F10MX1S1.

Além das alterações morfológicas, a célula pressionada com mitoxantrona começou a se multiplicar mais rapidamente a cada passagem, visto que após os primeiros tratamentos, a linhagem passou a adquirir confluência e necessitar de repiques em uma frequência parecida com a linhagem parental (3 a 4 subcultivos por semana). Assim, a concentração de tratamento com mitoxantrona foi aumentada para 2,5 nM. Após mais uma semana de exposição (semana 2), foram realizados novamente ensaios de citometria de fluxo e viabilidade celular.

Os resultados de citometria de fluxo após duas semanas de exposição foram similares aos observados na primeira semana, em que se pode observar um IRN entre ausência e presença de inibidor Ko143 para a linhagem pressionada, sugerindo um transporte mediado por ABCG2 devido a um aumento na expressão da proteína (TABELA 3) (FIGURA 13). De outro modo, pelo ensaio de viabilidade celular, o padrão de citotoxicidade entre as duas linhagens foi similar, sugerindo novamente uma ausência de transporte mediado por ABCG2 na linhagem pressionada, B16F10MX2.5S2. Contudo, diferentemente do perfil da semana 1, parece que a associação de mitoxantrona em baixas concentrações com Cromona 4a aumentou o efeito citotóxico da mitoxantrona.

FIGURA 13 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA - SEMANA 2

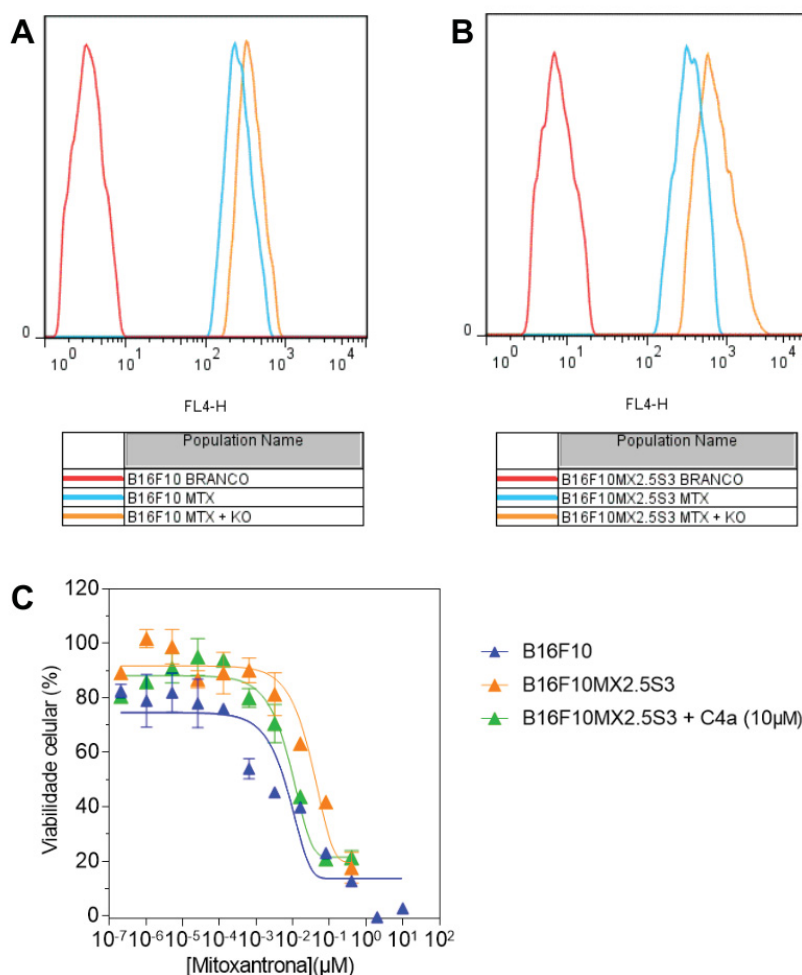




Nota: segunda semana de exposição de células B16F10 com 2,5 nM de mitoxantrona. O acúmulo intracelular de mitoxantrona em células parentais (B16F10) e pressionadas (B16F10MX1S1) foi realizado por citometria de fluxo. Ko143 1  $\mu$ M foi usado como inibidor de referência de ABCG2. (A) B16F10 parental. (B) B16F10MX2.5S2, que corresponde a exposição com 2.5 nM de mitoxantrona (MX2.5) por 1 semana (S2). A viabilidade (C) foi determinada pelo método MTT após 72h de exposição com concentrações crescentes de mitoxantrona. Dados representam a média  $\pm$  SD em replicata técnica.

Outro aspecto diferente comparando a primeira semana (B16F10MX1S1) e a segunda semana de pressão com mitoxantrona (B16F10MX2.5S2), foi que o crescimento das células começou a ficar mais lento a cada passagem. Por isso, a concentração de mitoxantrona para a terceira semana foi mantida em 2,5 nM. Interessantemente, a partir desse ponto, a linhagem parental B16F10 passou a evidenciar um delta de fluorescência mais pronunciado entre a condição com o inibidor específico, Ko143, e na ausência do mesmo. Isso pode sugerir que ao longo das passagens, as células começaram a expressar ABCG2. Em relação a linhagem pressionada B16F10MX2.4S3, observamos o mesmo padrão de deslocamento (TABELA 3) (FIGURA 14). Em relação ao resultado de viabilidade celular, não observamos uma diferença expressiva entre as 3 condições: B16F10, B16F10MX2.4S3 sem e com a Cromona 4a.

FIGURA 14 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA - SEMANA 3



Nota: terceira semana de exposição de células B16F10 com 2,5 nM de mitoxantrona. O acúmulo intracelular de mitoxantrona em células parentais (B16F10) e pressionadas (B16F10MX2.5S3) foi realizado por citometria de fluxo. Ko143 1  $\mu\text{M}$  foi usado como inibidor de referência de ABCG2. (A) B16F10 parental. (B) B16F10MX2.5S3, que corresponde a exposição com 2.5 nM de mitoxantrona (MX2.5) por 1 semana (S3). A viabilidade (C) foi determinada pelo método MTT após 72h de exposição com concentrações crescentes de mitoxantrona. Dados representam a média  $\pm$  SD em replicata técnica.

TABELA 3 – MEDIANAS DE FLUORESCÊNCIA E ÍNDICE DE RESISTÊNCIA DA EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA

Semana	Linhagem	Branco	MTX	MTX + Ko143	IRN
1	B16F10 parental	5,86	299,14	387,14	2,39
	B16F10MX1S1	17,15	384,85	594,85	
2	B16F10 parental	1,88	236,62	330,12	1,95
	B16F10MX2.5S2	4,21	292,79	474,79	
3	B16F10 parental	4,17	241,33	365,83	2,59
	B16F10MX2.5S3	7,44	324,57	646,57	

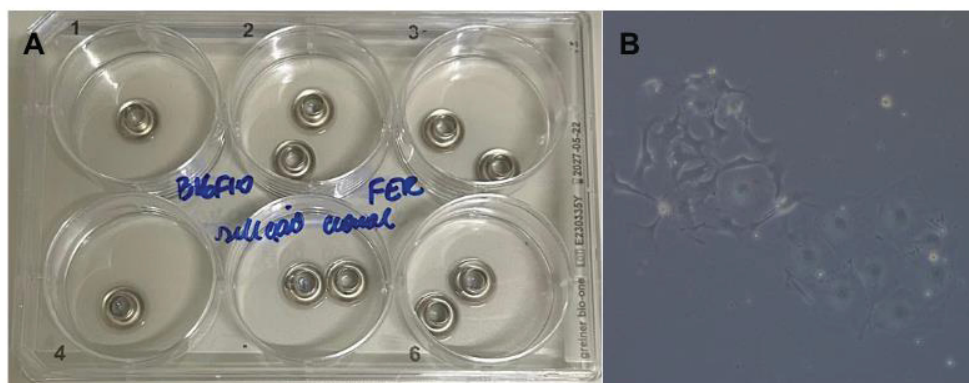
Nota: Valores de mediana de fluorescência obtidos nas três semanas de exposição à mitoxantrona, a partir de citometria de fluxo. Os valores de IRN foram calculados baseados na diferença entre a linhagem resistente com a linhagem parental (equação em materiais e métodos). As condições de tratamento realizadas foram: (i) células incubadas apenas com meio de cultivo (branco); (ii) células incubadas com substrato mitoxantrona 10  $\mu$ M (MTX); (iii) células incubadas com o substrato mitoxantrona 10  $\mu$ M e o inibidor Ko143 1  $\mu$ M (MTX + Ko143). Valores correspondem à média da intensidade de fluorescência dos experimentos realizados em replicata técnica, em casos em que apenas um resultado foi obtido, o valor individual foi considerado.

A partir desses dados, observou-se que mesmo após 3 semanas de pressão (B16F10MX2.5S3), não foi possível observar um fenótipo de resistência claramente associado a superexpressão de ABCG2, pelo menos nos ensaios de viabilidade celular, cujo resultado se demonstrou divergente ao perfil de aumento de efluxo evidenciado no ensaio por citometria de fluxo. Contudo, considerando as alterações morfológicas observadas com a exposição ao tratamento e diferenças no tempo de dobramento das células, optou-se por realizar uma seleção de clones após exposição com mitoxantrona.

## 6.2 OBTENÇÃO DE CLONES DE CÉLULAS B16F10 SELECIONADOS PELA EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA

A exposição da linhagem B16F10 parental ao quimioterápico mitoxantrona, bem como o método de identificação de clones para seleção foram realizados como mencionado no item 5.7.

FIGURA 15 – DEMARCAÇÃO DE CLONES DE B16F10 PARA EXPANSÃO E FUTURA EXPOSIÇÃO AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO



Nota: Obtenção de clones a partir da linhagem B16F10 parental. (A) Demarcação de clones e tripsinização, utilizando discos de metal, em placas de 6 poços. (B) Grupo de 5 a 10 células demarcadas para tripsinização, provenientes de um mesmo clone. Imagem obtida sob aumento de 100x (objetiva 10x/0,22)

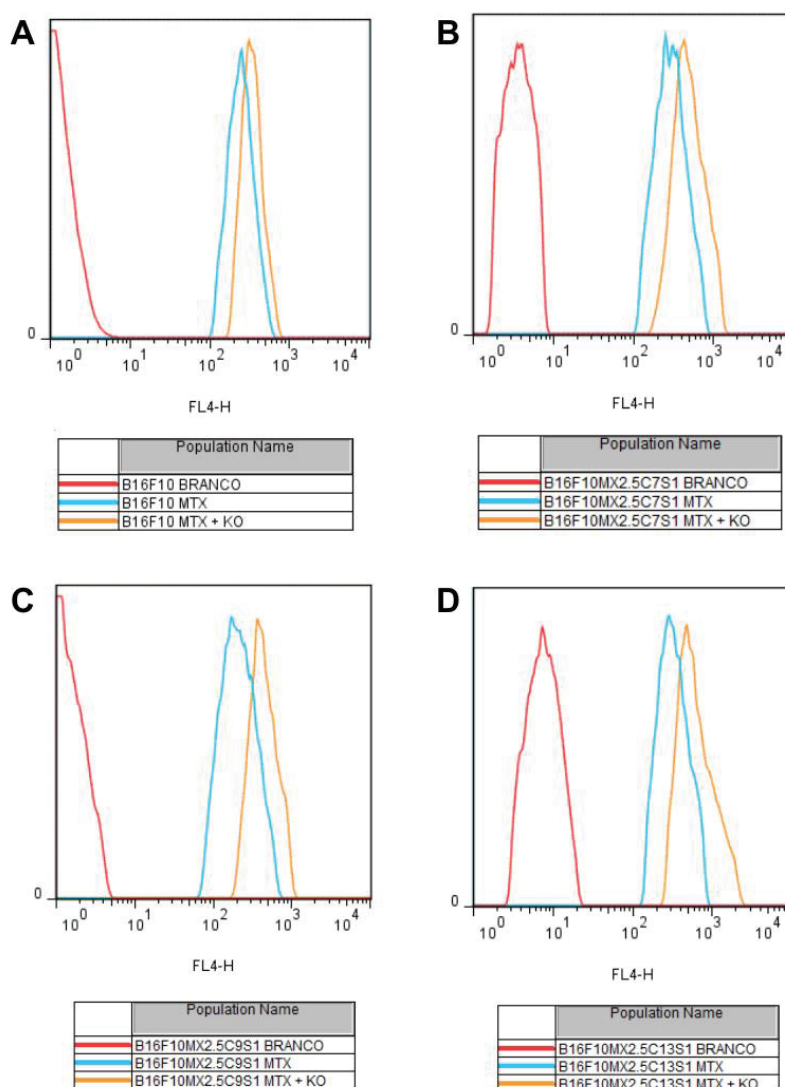
Nove dos vinte clones adquiriram confluência de 90 a 95% e se demonstraram promissores, sendo eles: B16F10MX2.5C2, C3, C7, C8, C9, C13, C14, C19 e C20. Essas células foram pressionadas no mesmo esquema de exposição apresentado anteriormente no item 5.3. Após uma semana de exposição com 2,5 uM de mitoxantrona, 6 clones adquiriram confluência (B16F10MX2.5C7, C9, C13, C17, C18 e C19). Estas células foram plaqueadas para análise de efluxo celular por citometria de fluxo (TABELA 4 ) (FIGURA 16).

TABELA 4 – MEDIANAS DE FLUORESCÊNCIA E ÍNDICE DE RESISTÊNCIA DA EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA – SEMANA 1

Linhagem	Branco	MTX	MTX + Ko143	IRN
B16F10 parental	1,32	237,69	325,19	1
B16F10MX2.5C7S1	3,58	277,42	461,42	2,10
B16F10MX2.5C9S1	1,20	197,80	409,89	2,42
B16F10MX2.5C13S1	7,37	301,63	549,63	2,83
B16F10MX2.5C17S1	6,93	274,07	454,07	2,05
B16F10MX2.5C18S1	7,93	318,07	524,07	2,35
B16F10MX2.5C19S1	7,58	380,42	648,42	3,06

Nota: Valores de mediana obtidos na primeira semana de exposição à mitoxantrona dos clones, a partir de citometria de fluxo. Os valores de IRN foram calculados baseados na diferença entre os clones com a linhagem parental. As condições de tratamento realizadas foram: (i) células incubadas apenas com meio de cultivo (branco); (ii) células incubadas com substrato mitoxantrona 10  $\mu$ M (MTX); (iii) células incubadas com o substrato mitoxantrona 10  $\mu$ M e o inibidor Ko143 1  $\mu$ M (MTX + Ko143). Valores correspondem à média da intensidade de fluorescência dos experimentos realizados em replicata técnica, em casos em que apenas um resultado foi obtido, o valor individual foi considerado.

FIGURA 16 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA DOS CLONES C7,C9 E 13 – SEMANA 1

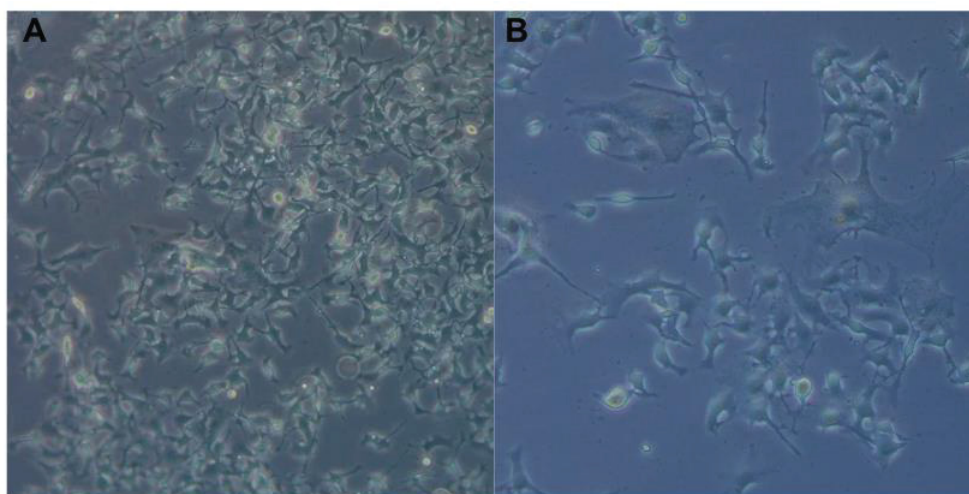


Nota: Primeira semana de exposição dos clones promissores com mitoxantrona. O acúmulo intracelular de mitoxantrona em células parentais (B16F10) e pressionadas (B16F10MX2.5C7S1, B16F10MX2.5C9S1 e B16F10MX2.5C13S1) foi realizado por citometria de fluxo. Ko143 1  $\mu$ M foi usado como inibidor de referência de ABCG2. (A) B16F10 parental. (B) B16F10MX2.5C7S1, que corresponde

a exposição do clone 7 (C7) com 2.5 nM de mitoxantrona (MX2.5) por 1 semana (S1). (C) B16F10MX2.5C9S1, que corresponde a exposição do clone 9 (C9) com 2.5 nM de mitoxantrona (MX2.5) por 1 semana (S1). (D) B16F10MX2.5C13S1, que corresponde a exposição do clone 13 (C13) com 2.5 nM de mitoxantrona (MX2.5) por 1 semana (S1). Dados representam a mediana  $\pm$  SD em replicata técnica.

Com base nos valores de medianas apresentados (TABELA 4) e histogramas (FIGURA16), comparando a linhagem parental (B16F10) com os clones (B16F10MX2.5C7, C9, C13, C17, C18 e C19), todos os clones obtiveram um deslocamento referente a um maior acúmulo de mitoxantrona intracelular quando em conjunto ao inibidor Ko143. Os clones inicialmente classificados como mais promissores foram: B16F10MX2.5C7S1, B16F10MX2.5C9S1 e B16F10MX2.5C13S1, devido ao crescimento expressivo e ao estabelecimento de subpopulações morfológicamente diferentes em variações de tamanho e formato (FIGURA 17).

FIGURA 17 – MORFOLOGIA DOS CLONES 7 E 9 DE B16F10 APÓS EXPOSIÇÃO POR 1 SEMANA COM MITOXANTRONA



Nota: Morfologia dos clones de B16F10 após 1 semana de pressão. (A) B16F10MX2.5C9S1. (B) B16F10MX2.5C7S1. Imagem obtida sob aumento de 100x (objetiva 10x/0,22).

Durante a segunda semana de pressão, observou-se que os 6 clones não apresentavam mais um bom crescimento, uma possível explicação para o crescimento reduzido seria a senescência causada pela exposição ao fármaco. Assim, o tratamento com mitoxantrona foi interrompido. As células ficaram 5 dias sem tratamento até adquirirem confluência e então, após 7 dias de exposição, os clones

promissores foram novamente plaqueados e analisados por citometria de fluxo (TABELA 5) (FIGURA18).

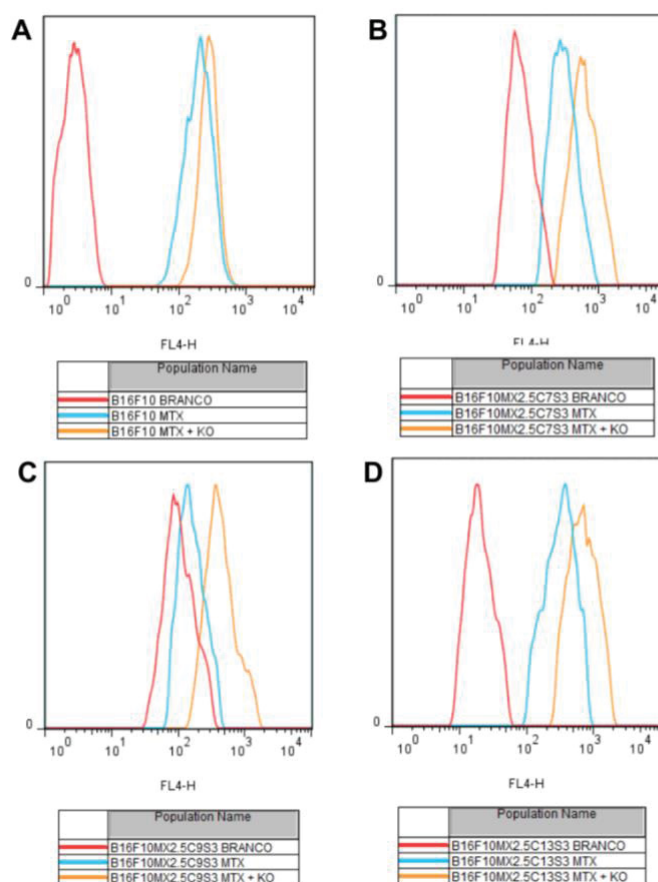
TABELA 5 – MEDIANAS DE FLUORESCÊNCIA E ÍNDICE DE RESISTÊNCIA DA EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA – SEMANA 3

Linhagem	Branco	MTX	MTX + K0143	IRN
B16F10 parental	2,81	192,19	269,19	1
B16F10MX2.5C7S3	66,50	221,50	517,50	3,84
B16F10MX2.5C9S3	98,20	51,80	302,80	3,26
B16F10MX2.5C12S3	9,34	306,66	725,66	5,44
B16F10MX2.5C13S3	19,20	301,80	643,80	4,44
B16F10MX2.5C14S3	13,30	364,70	857,70	6,40
B16F10MX2.5C19S3	112	302,00	767	6,03

Nota: Valores de mediana obtidos na terceira semana de exposição à mitoxantrona dos clones, a partir de citometria de fluxo. Os valores de IRN foram calculados baseados na diferença entre os clones com a linhagem parental. As condições de tratamento realizadas foram: (i) células incubadas apenas com meio de cultivo (branco); (ii) células incubadas com substrato mitoxantrona 10 $\mu$ M (MTX); (iii) células incubadas com o substrato mitoxantrona 10 $\mu$ M e o inibidor Ko 143 1 $\mu$ M (MTX+KO). Valores correspondem à média da intensidade de fluorescência dos experimentos realizados em replicata técnica, em casos em que apenas um resultado foi obtido, o valor individual foi considerado.



FIGURA 18 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA DOS CLONES C7,C9 E 13 – SEMANA 3



Nota: Terceira semana de exposição dos clones promissores com mitoxantrona. O acúmulo intracelular de mitoxantrona em células parentais (B16F10) e pressionadas (B16F10MX2.5C7S3, B16F10MX2.5C9S3 e B16F10MX2.5C13S3) foi realizado por citometria de fluxo. Ko143 1  $\mu$ M foi usado como inibidor de referência de ABCG2. (A) B16F10 parental. (B) B16F10MX2.5C7S3, que corresponde a exposição do clone 7 (C7) com 2.5 nM de mitoxantrona (MX2.5) por 3 semanas (3). (C) B16F10MX2.5C9S3, que corresponde a exposição do clone 9 (C9) com 2.5 nM de mitoxantrona (MX2.5) por 3 semana (S3). (D) B16F10MX2.5C13S3, que corresponde a exposição do clone 13 (C13) com 2.5 nM de mitoxantrona (MX2.5) por 3 semanas (S3). Dados representam a mediana  $\pm$  SD em replicata técnica.

Depois de 14 dias de pressão, considerando que na segunda semana as células não foram tratadas, observou-se um aumento expressivo no índice de resistência (IRN) em todos os clones. Porém, conforme o tempo de pressão se estendia, os clones que mantiveram um crescimento expressivo foram: B16F10MX2.5C7S3, B16F10MX2.5C9S3 e B16F10MX2.5C13S3.



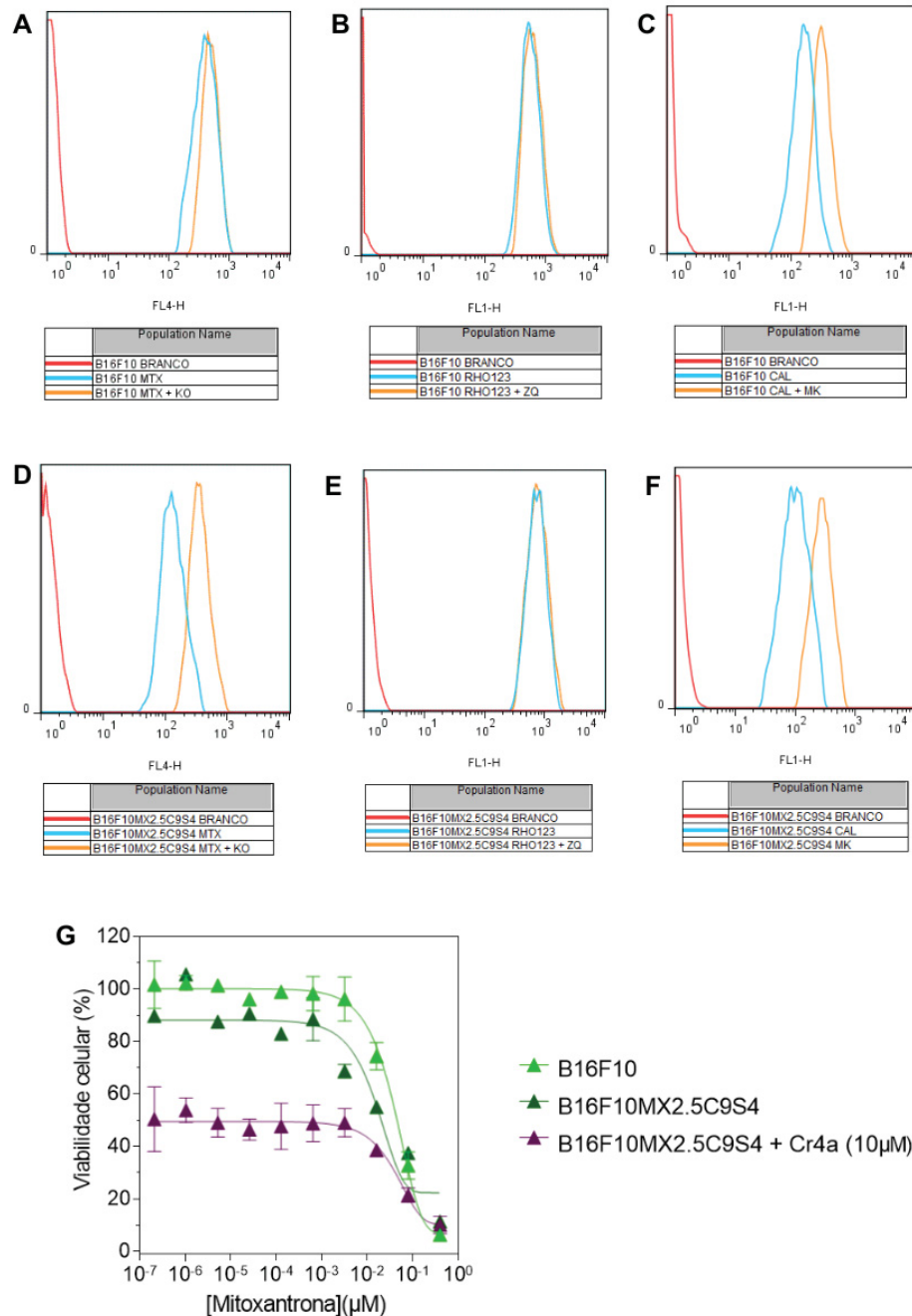
Assim, para completar os 21 dias de exposição com mitoxantrona, foi realizada uma última semana de pressão, seguida do congelamento de pellets dos clones promissores, realização do ensaio de citometria de fluxo (FIGURA 19) e RT-qPCR (FIGURA 20), agora para os 3 transportadores (ABCB1, ABCC1 e ABCG2). O clone que mais apresentou resultados promissores (IRN = 2,57), bem como crescimento expressivo com a presença do quimioterápico, foi o B16F10MX2.5C9S4. Desse modo, novo ensaio de viabilidade celular foi realizado para comparação com o primeiro teste de exposição, prévio a seleção clonal. Conforme observado na figura 19G, a linhagem B16F10MX2.5C9S3 não apresentou um perfil de curva de citotoxicidade diferente da célula parental B16F10. Ainda assim foi possível observar que a associação da Cromona 4a potencializou o efeito da mitoxantrona nas células B16F10MX2.5C9S4, efeito normalmente observado quando um inibidor reverte o fenótipo de resistência mediado pelo transportador ABCG2 (FIGURA19G).

TABELA 6 – MEDIANAS DE FLUORESCÊNCIA E ÍNDICE DE RESISTÊNCIA DA EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA – SEMANA 4

Linhagem	Transportador	Branco	Substrato	Substrato + Inibidor	IRN
B16F10 parental	ABCG2	1,26	389,74	474,74	1
	ABCB1	1,01	532,99	583,99	1
	ABCC1	1,01	157,99	308,99	1
B16F10MX2.5C7S4	ABCG2	1,98	127,02	325,02	2,33
	ABCB1	1,01	594,99	608,99	0,27
	ABCC1	1,01	106,99	268,99	1,07
B16F10MX2.5C9S4	ABCG2	1,22	126,78	345,78	2,57
	ABCB1	1,01	720,99	938,99	0,35
	ABCC1	1,01	214,99	265,99	1,11
B16F10MX2.5C13S4	ABCG2	1,27	167,73	345,73	2,10
	ABCB1	1,03	603,97	606,97	0,06
	ABCC1	1,03	103,97	270,97	1,10

Nota: Valores de mediana obtidos na quarta semana de exposição à mitoxantrona dos clones, a partir de citometria de fluxo. Os valores de IRN foram calculados baseados na diferença entre os clones com a linhagem parental. As condições de tratamento realizadas foram: (i) células incubadas apenas com meio de cultivo (branco); (ii) células incubadas com substrato mitoxantrona 10 µM para ABCG2, rodamina 123 10 µM para ABCB1 e Calceína-AM a 0,15 µM para ABCC1; (iii) células incubadas com o substrato mitoxantrona 10 µM e o inibidor Ko 143 1 µM para ABCG2, o substrato rodamina123 10 µM e o inibidor Zozuquidar a 1 µM para ABCB1 e o substrato Calceína-AM 0,15 µM e o inibidor MK-571 50 µM para ABCC1. Valores correspondem à média dos experimentos realizados em replicata técnica, em casos em que apenas um resultado foi obtido, o valor individual foi considerado.

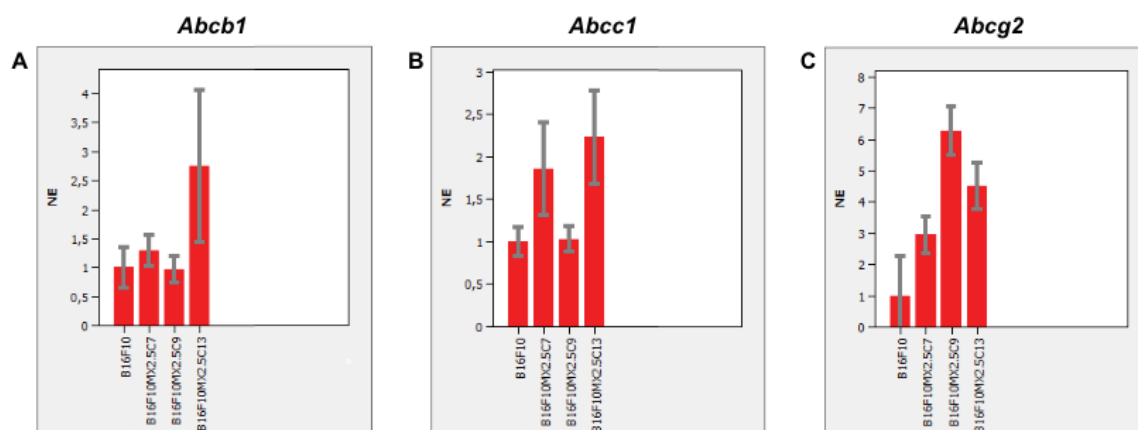
FIGURA 19 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA DO CLONE 9 – SEMANA 4



Nota: Quarta semana de exposição dos clones promissores com mitoxantrona. O acúmulo intracelular de mitoxantrona em células parentais (B16F10) e pressionadas (B16F10MX2.5C9S4) foi realizado por citometria de fluxo. Ko143 1 µM foi usado como inibidor de referência de ABCG2, Zosuquidar 1 µM foi utilizado como inibidor de referência de ABCB1 e MK-571 50 µM para ABCC1. (A-C) B16F10 parental. (D-F) B16F10MX2.5C9S4, que corresponde a exposição do clone 9 (C9) com 2.5 nM de mitoxantrona (MX2.5) por 4 semanas (S4). A viabilidade (C) foi determinada pelo método MTT após 72h de exposição com concentrações crescentes de mitoxantrona. Dados representam a mediana ± SD em replicata técnica.

Desde a primeira semana de exposição com mitoxantrona, o clone B16F10MX2.5C9 apresentou resultados satisfatórios, com um IRN de 2.42. Na segunda semana, o índice de resistência do clone sob exposição foi ainda mais expressivo, tendo um resultado de 3,26. Ao realizar o ensaio de citometria de fluxo avaliando os 3 principais transportadores relacionados a MDR, pode-se observar que a linhagem manteve um IRN superior a 2 para ABCG2, e não teve resultados expressivos para P-gp e MRP1. Porém, observando os resultados da linhagem parental, podemos observar que existe um transporte de calceína na linhagem B16F10 e que se mantém ou levemente foi aumentado na linhagem B16F10MX2.5C9S4. Esse resultado sugere que a célula parental B16F10 não expressa *Abcb1* e *Abcg2*, mas possui uma expressão de transportadores da família *Abcc*. Não podemos afirmar qual membro da família ABC está envolvido, pois o inibidor MK-571 não é específico para ABCC1 (MRP1) e pode inibir outros membros da mesma família ABCC (MRPs), como MRP4 (Reid, 2003) e MRP5 (Reid, 2003).

Considerando que todos os clones selecionados obtiveram índices de resistência satisfatórios no ensaio de efluxo, sugerindo que a pressão com mitoxantrona induziu a superexpressão de *Abcg2*, seguimos para avaliação do efeito em níveis transcricionais. Para essa análise, os níveis de RNAm de *Abcb1*, *Abcc1* e *Abcg2* foram avaliados nas células B16F10MX2.5 clones C7, 9 e 13. O clone B16F10MX2.5C7S4 apresentou um leve aumento na expressão de *Abcb1* e *Abcg2* (FIGURA 20), enquanto o clone B16F10MX2.5C13S4 apresentou um aumento na expressão dos 3 transportadores ABC. De forma muito interessante, para o clone C9 (B16F10MX2.5C9S4), o tratamento com mitoxantrona induziu um pronunciado aumento na expressão apenas do gene que codifica para o transportador ABCG2 (FIGURA 20).

FIGURA 20 – EXPRESSÃO GÊNICA DE *Abcb1*, *Abcc1* E *Abcg2* DOS CLONES C7, C9 E C13

Nota: Valores de expressão normalizada (NE) dos transportadores ABC. (A) *Abcb1*. (B) *Abcc1*. (C) *Abcg2*. Foram comparados os valores de expressão de RNA das células B16F10, B16F10MX2.5C7S4, B16F10MX2.5C9S4 e B16F10MX2.5C13S4, que correspondem a exposição dos clones com 2.5 nM de mitoxantrona (MX2.5) por 4 semanas (S4). Dados representam a mediana  $\pm$  SD em triplicata técnica.

Dessa forma, entende-se que foi possível estabelecer uma linhagem que, ao manter o tratamento de 2,5 nM por 21 dias, superexpressa *Abcg2*. Considerando os resultados obtidos, as células do clone B16F10MX2.5C9S4 foram expandidas e congeladas. Após descongelamento desse clone, a célula foi novamente exposta a 1 semana de pressão com 2,5 nM de mitoxantrona e os experimentos de citometria de fluxo e MTT foram repetidos.

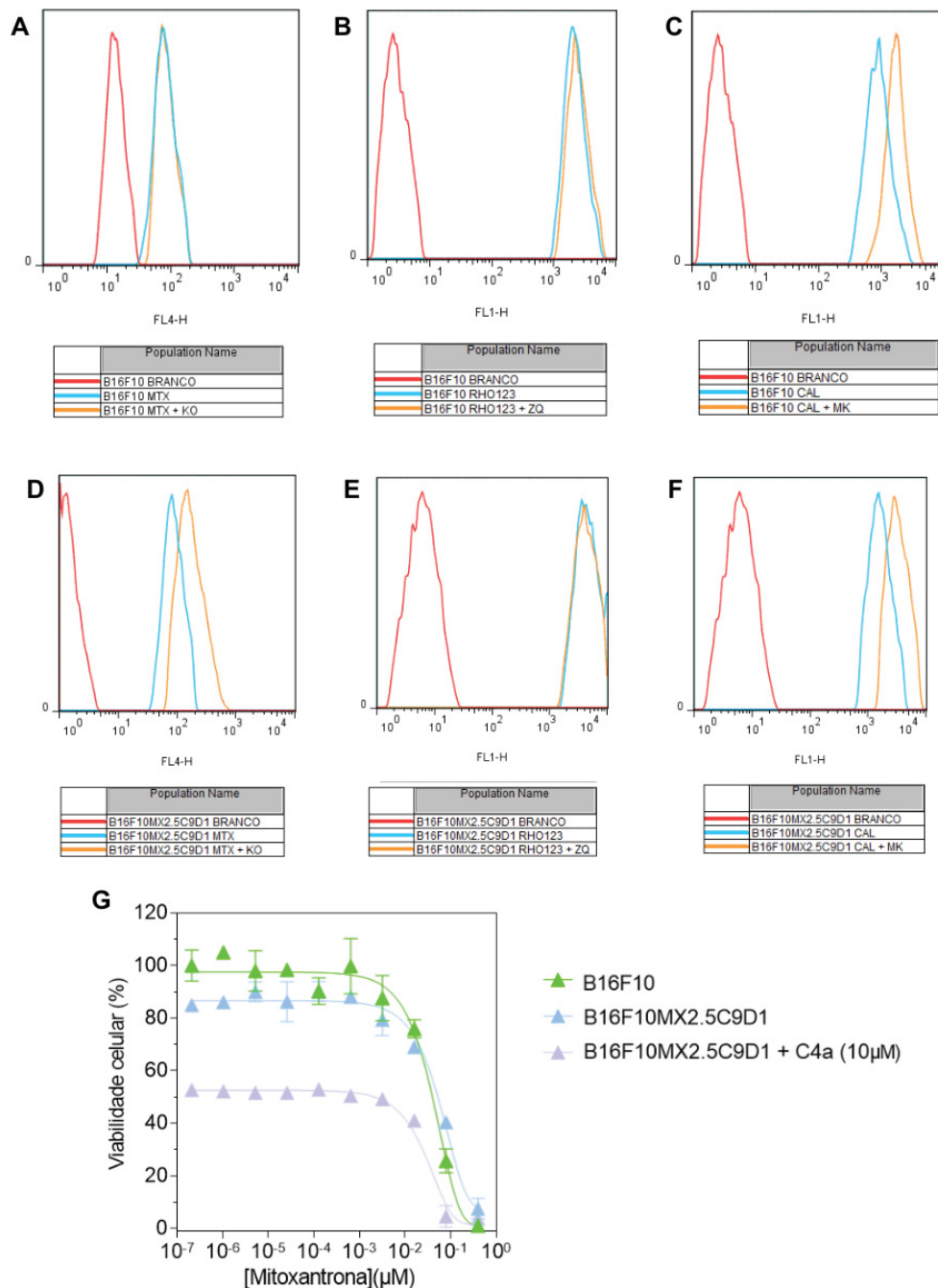
Considerando os resultados após o descongelamento (FIGURA 21 e TABELA 7), concluiu-se que a linhagem B16F10MX2.5C9S4 superexpressa *Abcg2*, com resultados similares aos obtidos antes do congelamento. Ainda, pode-se observar que a curva de viabilidade também manteve o perfil apresentado pré-congelamento (FIGURA 21C).

TABELA 7 – MEDIANAS DE FLUORESCÊNCIA E ÍNDICE DE RESISTÊNCIA DA EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA APÓS DESCONGELAMENTO

Linhagem	Transportador	Branco	Substrato	Substrato + Inibidor	IRN
B16F10 parental	ABCG2	13,50	65,90	68,10	1
	ABCB1	2,77	2081,23	2340,23	1
	ABCC1	2,77	854,23	1633,23	1
B16F10MX2.5C9D1	ABCG2	1,34	84,16	156,66	32,9
	ABCB1	6,09	4259,91	4344,91	0,32
	ABCC1	6,09	1498,91	3147,91	2,11

Nota: Valores de mediana obtidos após descongelamento e 1 semana de exposição à mitoxantrona do clone B16F10MX2.5C9S4, a partir de citometria de fluxo. Os valores de IRN foram calculados baseados na diferença entre os clones com a linhagem parental. As condições de tratamento realizadas foram: (i) células incubadas apenas com meio de cultivo (branco); (ii) células incubadas com substrato mitoxantrona 10  $\mu$ M para ABCG2, rodamina 123 10  $\mu$ M para ABCB1 e Calceína-AM a 0,15  $\mu$ M para ABCC1; (iii) células incubadas com o substrato mitoxantrona 10  $\mu$ M e o inibidor Ko143 1 $\mu$ M para ABCG2, o substrato rodamina 123 10  $\mu$ M e o inibidor Zosuquidar a 1 $\mu$ M para ABCB1 e o substrato Calceína-AM 0,15  $\mu$ M e o inibidor MK-571 50  $\mu$ M para ABCC1. Valores correspondem à média dos experimentos realizados em replicata técnica, em casos em que apenas um resultado foi obtido, o valor individual foi considerado.

FIGURA 21 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EFLUXO E VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO COM MITOXANTRONA DO CLONE 9 POR 1 SEMANA APÓS DESCONGELAMENTO



Nota: Primeira semana de exposição do clone B16F10MX2.5C9S4 com mitoxantrona após descongelamento. O acúmulo intracelular de mitoxantrona em células parentais (B16F10) e pressionada B16F10MX2.5C9S4 após o descongelamento foi realizado por citometria de fluxo. Ko143 1  $\mu$ M foi usado como inibidor de referência de ABCG2, Zozuquidar 1  $\mu$ M foi utilizado como inibidor de referência de ABCB1 e MK-571 50  $\mu$ M para ABCC1. (A-C) B16F10. (D-F) B16F10MX2.5C9S4, que corresponde a exposição do clone 9 (C9) com 2.5 nM de mitoxantrona (MX2.5) por 1 semana após descongelamento. A viabilidade foi determinada pelo método MTT após 72h de exposição com concentrações crescentes de mitoxantrona. Dados representam a mediana  $\pm$  SD em replicata técnica.

A seleção de clones é uma estratégia interessante, pois permite que a linhagem obtida apresente menos heterogeneidade, visto que todas as células são provindas de um mesmo clone que foi exposto ao tratamento. Apesar de clinicamente as neoplasias malignas apresentarem grande heterogeneidade (Dagogo-Jack; Shaw, 2018), em ensaios *in vitro* essa característica pode afetar a constância dos resultados, visto que em populações celulares não selecionadas ocorre uma variabilidade maior de expressão dos transportadores ABC. Ao selecionar clones, foi possível observar maior especificidade, principalmente no clone B16F10MX2.5C9S4, para o transportador Abcg2. Cabe ressaltar que o substrato utilizado para exposição é transportado por ABCB1 e ABCG2 (Marques et al., 2025).

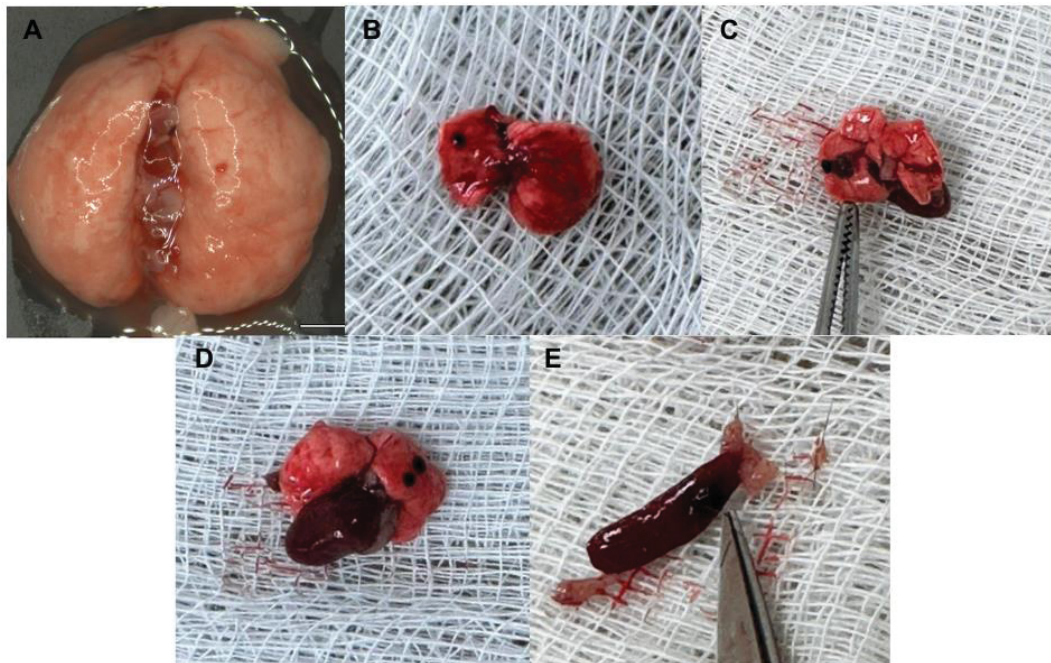
### 6.3 MODELO DE METÁSTASE *in vivo* (PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO)

Vislumbrando a padronização de um ensaio *in vivo* de metástase para testar inibidores do transportador ABCG2, o modelo que faz uso de camundongos C57BL/6 inoculados com células B16F10 foi selecionado. Esse modelo foi escolhido pois possibilita que se estude o uso de inibidores em um modelo metastático, que se desenvolve em poucos dias no animal (Fidler, 1973).

Seguindo o procedimento descrito por (Bellan et al., 2020; Brito et al., 2020) e após testes com PBS para conseguir fazer a injeção na veia caudal dos animais, iniciamos os testes com inoculação de células seguidos da eutanásia dos animais após 21 dias.



FIGURA 22 – FOCOS DE METÁSTASE EM CAMUNDONGOS C67BL/6



Legenda: Focos de metástases em camundongos após a inoculação de células B16F10 na veia caudal. (A) Controle, imagem gentilmente fornecida por Micheli de Marchi. (B-D) Pulmões e coração. (E) Baço.

Com base nesses resultados de padronização e comparados com a literatura, conclui-se que a inoculação de células B16F10 foi efetiva e gerou focos de metástase nos pulmões (FIGURA 22). Assim, nos próximos testes, células B16F10MX2.5C9S4 que expressam Abcg2 serão inoculadas nos camundongos C57BL/6 para avaliar metástase pulmonar. Nesse experimento, os animais serão tratados com quimioterapia sozinha e associada com a Cromona 4a para avaliar o benefício do uso de inibidores do transportador ABCG2.

#### 6.4 MODELOS DE MEMBRANA CORIOALANTOIDE (PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO)

O modelo de membrana corioalantoide (CAM), apesar de ser mais utilizado para avaliar efeitos sobre a angiogênese, também serve para auxiliar estudos de



investigação de efeito antitumoral, tanto em tumor primário (Komatsu; Higashi; Matsumoto, 2019)) quanto em metástase (Ribatti, 2017). Inicialmente, para testar o modelo de CAM no contexto de MDR mediada pelo transportador ABCG2, um *screening* com diferentes linhagens foi testado (TABELA 8). No primeiro teste foram inoculadas  $1.10^4$  e  $1.10^5$  células de cada linhagem, suspensas em 20  $\mu$ L de PBS diretamente na membrana no 10º dia de incubação. Após 3 dias de inoculação, no 14º dia de incubação, foi realizada a eutanásia. Dos 24 ovos testados, apenas 2 embriões sobreviveram, os que foram inoculados com as linhagens HEK293-ABCG2 e A549MX20.

TABELA 8 – LINHAGENS CELULARES TESTADAS NA MEMBRANA CORIOALANTOIDE

LINHAGEM	TIPO CELULAR	Obtenção da expressão de ABCG2
HEK293- <b>ABGC2</b>	Rim embrionário humano	Transfecção estável (Robey, 2004)
NIH3T3MX15	Fibroblastos de camundongo derivado de NIH3T3	Pressão com mitoxantrona (Bakhsheshian et al., 2013)
H460MX20	Carcinoma pulmonar humano	Pressão com mitoxantrona (Zhang et al., 2017)
PANC1 MX100	Adenocarcinoma pancreático	Pressão com mitoxantrona (Zattoni et al., 2022)
MCF7MX100	Adenocarcinoma de mama humano	Pressão com mitoxantrona (Bairoch, 2018)
A549MX20	Adenocarcinoma de pulmão humano	Pressão com mitoxantrona (Wu et al., 2025)

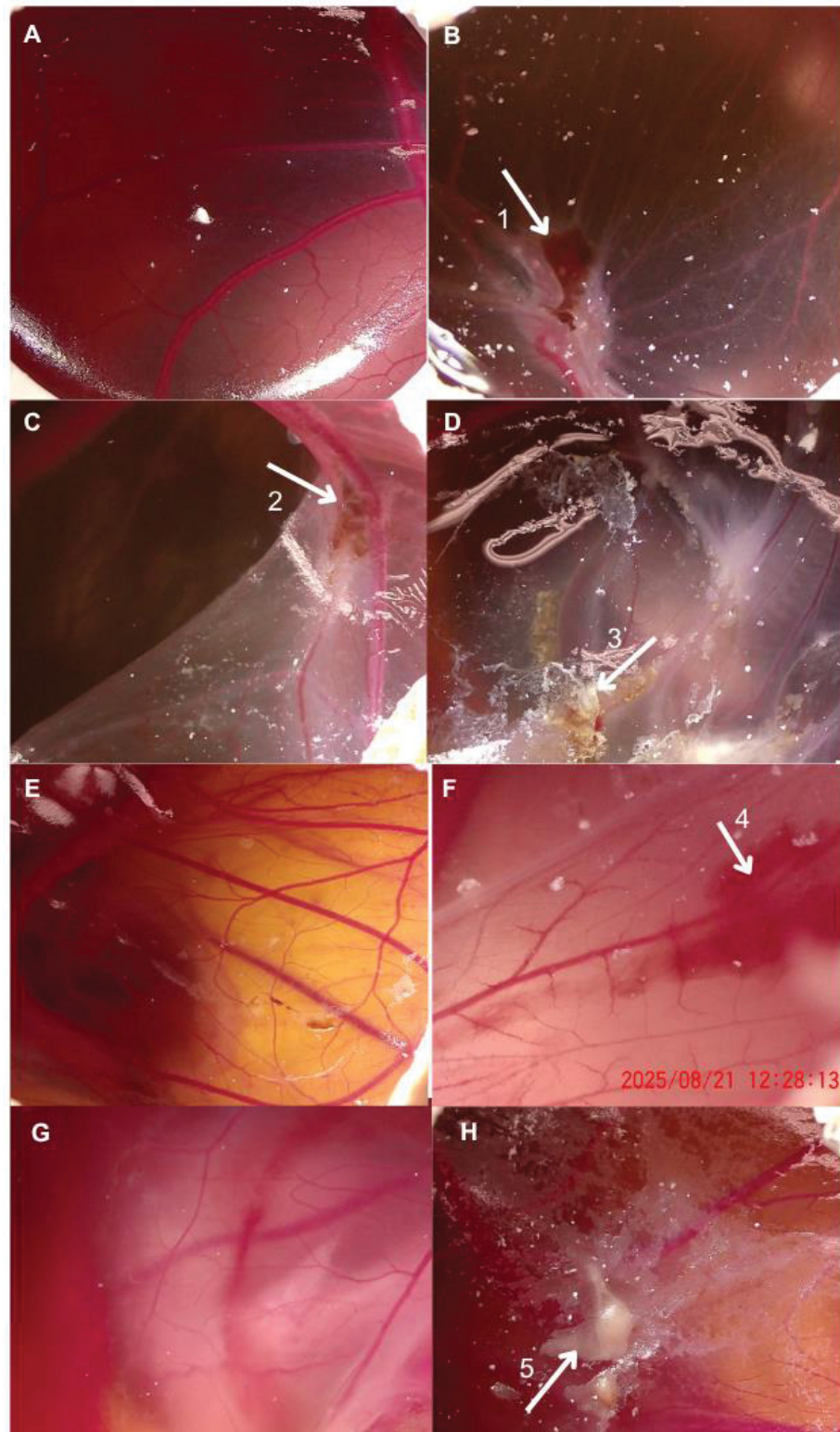
Algumas possíveis explicações para a alta mortalidade são: (i) veículo utilizado, PBS; (ii) tempo longo de incubação após inoculação (4 dias); e (iii) contaminação por bactérias oportunistas presentes na casca desse lote de ovos. Baseando-se no modelo proposto por Oliveira et al. (2024), as células passaram a ser resuspendidas em seus respectivos meios de cultivo e inoculadas em implantes de gelatina que, após polimerização, eram dispostos em cima da membrana corioalantoide. Para simplificar o experimento, os próximos ensaios foram realizados com apenas duas linhagens, uma transfectada (HEK293-ABCG2) e outra selecionada por pressão (H460MX20).

Como resultados dos novos testes, foi possível observar um aumento do número de embriões que sobreviveram após inoculação das células no 10º dia de

incubação, com a eutanásia realizada no 13º dia de incubação, que corresponde a 72 horas da inoculação com as células. Apesar da redução da mortalidade, não foi possível observar a formação de tumores. Esses testes foram realizados utilizando concentrações de  $1.10^4$ ,  $1.10^5$  e  $1.10^6$  células/mL, sendo principalmente as concentrações de  $1.10^6$ /mL frequentemente utilizadas (Al Dhaheri, 2013).

Considerando os testes iniciais, na sequência foi testada a concentração de  $1.10^7$  células/mL, baseando-se em Oliveira et al. (2024). Nessa condição foi possível observar o desenvolvimento celular sobre os vasos da membrana corioalantoide, sendo que para a linhagem HEK293-ABCG2 observa-se uma massa de coloração acastanhada (FIGURA 23A - D, setas 1 a 3), enquanto na linhagem H460MX20 formou-se uma massa branca centralizada (FIGURA 23G e H, seta 5). Outro achado interessante foi demonstrado na Figura 23F, que apresenta o tropismo das células ao vaso (seta 4), questão a ser explorada em futuros ensaios.

FIGURA 23 –DESENVOLVIMENTO DE MASSAS TUMORAIS APÓS INOCULACAO DE CÉLULAS HEK293-ABCG2 E H460MX20, NA CAM



Nota: Inoculação de células humanas na membrana corioalantoide (CAM). (A) Membrana tratada apenas com controle de meio de cultivo DMEM alta glucose. (B-F) Membrana inoculada com células HEK293-ABCG2 em uma concentração de  $1.10^7$  células/mL. (G) Membrana tratada apenas com controle de meio de cultivo RPMI. (H) Membrana inoculada com células H460MX20 em uma concentração de  $1.10^7$  células/mL. Imagens feitas utilizando o microscópio digital DM12, 10,1-inch, lentes ópticas em tamanho 1/2.8\*.

A versatilidade do modelo de inoculação na membrana corioalantoide possibilita a utilização de diversas linhagens celulares (Ribatti, 2017). A linhagem H460 já foi utilizada previamente (Ribatti, 2023), assim como a própria linhagem B16F10 (Komatsu; Higashi; Matsumoto, 2019), estudada nesse projeto, sendo uma possibilidade também para futuros experimentos neste modelo. Com o estabelecimento da linhagem B16F10MX2.5C9S4, seria uma opção de escolha para ensaios utilizando inibidores e substratos de ABCG2 no modelo de melanoma, que também é interessante devido a alta capacidade metastática da linhagem para observar o desenvolvimento tumoral no embrião. Cabe ressaltar que o tempo de inoculação aparenta ser diretamente dependente da linhagem utilizada, podendo levar de 2 a 10 dias para o desenvolvimento do tumor (Komatsu; Higashi; Matsumoto, 2019). Desse modo, demonstra-se necessário uma nova análise do tempo de incubação após a inoculação para cada linhagem a ser futuramente testada no modelo.

Ainda existem desafios no aperfeiçoamento do modelo, sendo o principal deles a mortalidade alta, provavelmente por contaminação do embrião, o que diminui o número. Todavia, ao final, um protocolo de inoculação celular na CAM foi estabelecido, seja para avaliação de um tumor primário quanto para investigação de possíveis metástases.

## **7. CONCLUSÃO**

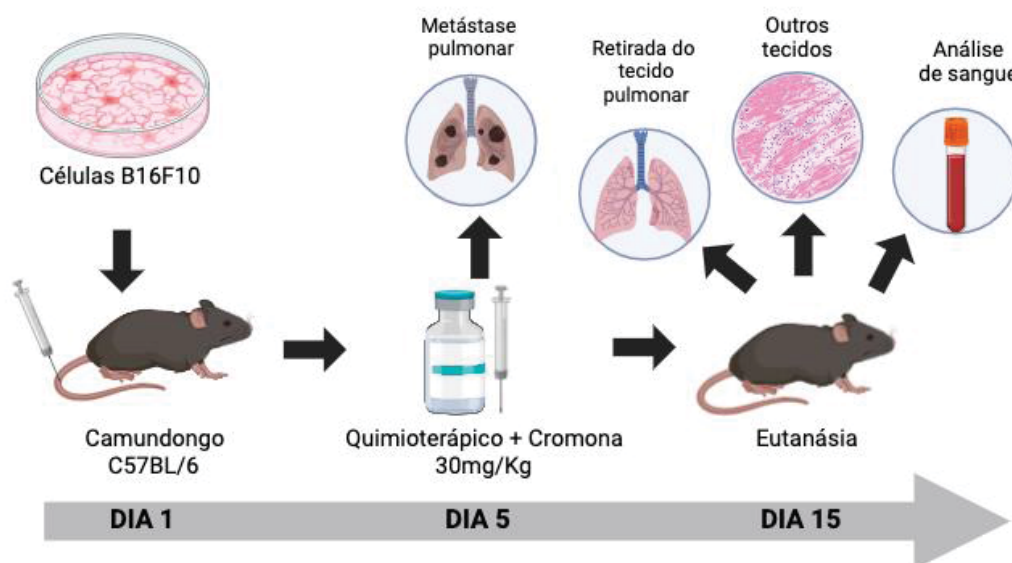
Considerando os resultados obtidos neste projeto, foi possível estabelecer uma linhagem de melanoma murino superexpressando Abcg2 (B16F10MX2.5C9S4). O modelo de tumor metastático foi validado em animais C57BL/6, possibilitando agora o estudo com a linhagem superexpressando Abcg2. Isso permitirá futuramente a inoculação das células B16F10MX2.5C9S4 nesse modelo animal para validar o uso de inibidores do transportador ABCG2, como a Cromona 4a. Por fim, foi estabelecido um protocolo de inoculação de células na membrana corioalantoide de embriões de galinha, formando tumores visíveis e dando espaço para futuros ensaios de metástase e testes com inibidores.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

### 8.1 ENSAIOS *in vivo* DE METÁSTASE COM A CROMONA 4a

Com o modelo de inoculação previamente estabelecido, o projeto já aprovado pelo comitê de ética citado anteriormente poderá ser iniciado. O esquema experimental (FIGURA 24) utilizará camundongos Black C57BL/6 com 6 semanas de vida, inoculados pela veia caudal com células de melanoma murino da linhagem B16F10MX2.5C9S4, nesse modelo a metástase é esperada em 5 dias após inoculação, sendo seu principal foco pulmonar. Após o período necessário para desenvolvimento da metástase, os camundongos serão tratados com os quimioterápicos escolhidos (Mitoxantrona, Irinotecano e Doxorrubicina) assim como seu uso em conjunto com o inibidor de ABCG2, Cromona 4a. O tratamento terá duração de 10 dias e então os animais serão eutanasiados e terão coleta de tecidos e sangue para análises histológicas e bioquímicas.

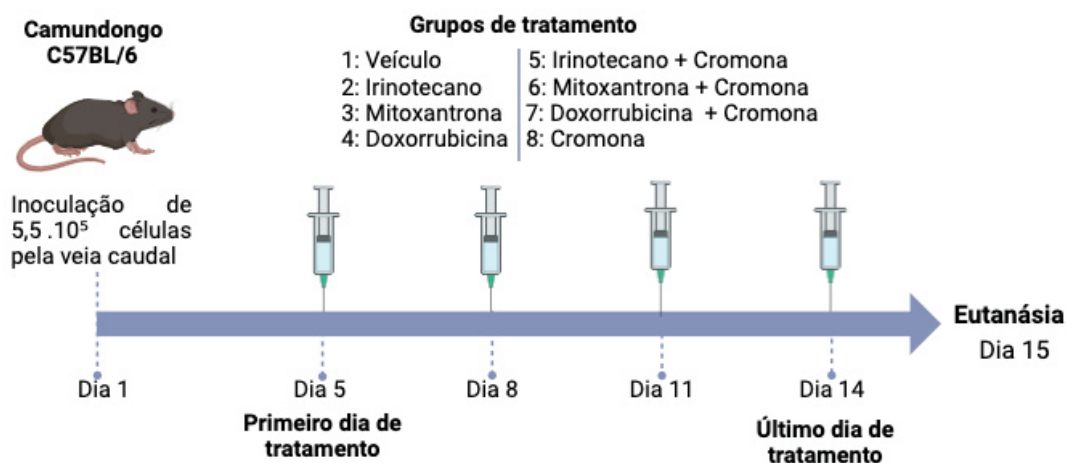
FIGURA 24 – ESQUEMA DE INOCULACAO DO MODELO DE METÁSTASE EM CAMUNDONGOS C57BL/6



FONTE: A autora, 2025. Feito com BioRender

O tratamento terá início a partir do 5º dia, sendo uma injeção a cada 2 dias via intraperitoneal, totalizando 10 dias de tratamento (FIGURA 25). O veículo utilizado será PBS + DMSO/óleo. A concentração de Cromona 4a será de 30 mg/kg, sendo a toxicidade do composto avaliada em outro comitê de ética também em processo de aprovação. As concentrações de quimioterápicos irinotecano, mitoxantrona e doxorrubicina foram embasadas na literatura e serão de 20 mg/kg, 6 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente (Honorat et al., 2014; Dias-Carvalho et al., 2023; Kwon et al., 2022). Cada grupo de tratamento será composto por 10 machos e 10 fêmeas.

FIGURA 25 – ESQUEMA DE TRATAMENTO DO MODELO DE METÁSTASE EM CAMUNDONGOS C57BL/6



FONTE: A autora, 2025. Feito com Bio Render

## 8.2 TESTES NA MEMBRANA CORIOALANTOIDE COM INIBIDORES

Com o modelo de tumor primário estabelecido, os próximos ensaios com a CAM terão como principal objetivo o estudo da toxicidade de quimioterápicos substratos de ABCG2 sozinho e em associação com a Cromona 4a. No ensaio, o tratamento com os compostos ocorrerá no dia 11 de incubação. 24 horas após a inoculação das linhagens, a janela dos ovos será reaberta para realização do tratamento e em seguida os ovos serão levados para incubação até a eutanásia.



Como trata-se de um ensaio piloto, nas próximas etapas, vamos aperfeiçoar o modelo a partir dos resultados obtidos.

### 8.3 ESTABELECIMENTO DE UM MODELO DE METÁSTASE NA MEMBRANA CORIOALANTOIDE

Em um primeiro momento, será realizada a imunohistoquímica dos embriões e membranas (CAM) armazenados em formol para identificar possíveis focos metastáticos a partir da inoculação do tumor primário. Em seguida, espera-se adaptar o modelo previamente estabelecido para injeção de células diretamente no vaso da membrana corioalantoide, técnica que exige diversas adaptações e materiais específicos a serem estudados e identificar assim o desenvolvimento e sobrevivência celular ao percorrer os vasos até o embrião assim como os principais focos de metástase possíveis com a técnica.

## REFERÊNCIAS

ALAM, Amer; LOCHER, Kaspar P. Structure and Mechanism of Human ABC Transporters. **Annual Review of Biophysics**, v. 52, n. 1, p. 275–300, 9 maio 2023.

AL DHAHERI, Yusra *et al.* Anti-Metastatic and Anti-Tumor Growth Effects of *Origanum majorana* on Highly Metastatic Human Breast Cancer Cells: Inhibition of NFκB Signaling and Reduction of Nitric Oxide Production. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68808, 10 jul. 2013.

ALLIKMETS, R. *et al.* A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. **Cancer research**, v. 58, n. 23, p. 5337–9, 1 dez. 1998.

ALMAZROUEI, Khalaf Mohamed *et al.* Tumor Microenvironment and Its Role in Cancer Progression: An Integrative Review. **Cureus**, 19 set. 2025.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, Laura *et al.* ABCG2 Transporter: From Structure to Function—Current Insights and Open Questions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 13, p. 6119, 25 jun. 2025.

BAKHSHESHIAN, Joshua *et al.* Overlapping Substrate and Inhibitor Specificity of Human and Murine ABCG2. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 41, n. 10, p. 1805–1812, out. 2013.

BAILEY-DELL, Kimberly J. *et al.* Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1520, n. 3, p. 234–241, set. 2001.

BAILLY, Christian. Irinotecan: 25 years of cancer treatment. **Pharmacological Research**, v. 148, p. 104398, out. 2019.

BAIROCH, A. The Cellosaurus, a cell-line knowledge resource. *Nucleic Acids Research*, 2018.

Entry: **MCF-7** **MX100** **(RRID:CVCL\_LB54)**. Disponível em: [https://www.cellosaurus.org/CVCL\\_LB54](https://www.cellosaurus.org/CVCL_LB54)



BARIL, Stefanie A.; GOSE, Tomoka; SCHUETZ, John D. How Cryo-EM Has Expanded Our Understanding of Membrane Transporters. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 51, n. 8, p. 904–922, ago. 2023.

BELLAN, D. L. *et al.* Green does not always mean go: A sulfated galactan from *Codium isthmocladum* green seaweed reduces melanoma metastasis through direct regulation of malignancy features. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, p. 116869, dez. 2020.

BRITO, Patricia Manuitt *et al.* Oral exposure to BDE-209 modulates metastatic spread of melanoma in C57BL/6 mice inoculated with B16–F10 cells. **Chemosphere**, v. 260, p. 127556, dez. 2020.

BUKOWSKI, Karol; KCIUK, Mateusz; KONTEK, Renata. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2 maio 2020.

CALCAGNO, A. M. *et al.* Single-step doxorubicin-selected cancer cells overexpress the ABCG2 drug transporter through epigenetic changes. **British Journal of Cancer**, v. 98, n. 9, p. 1515–1524, 1 maio 2008.

CHEN, Kevin G. *et al.* Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 22, n. 6, p. 740–749, 14 dez. 2009.

COLE, S. P. C. *et al.* Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line. **Science**, v. 258, n. 5088, p. 1650–1654, 4 dez. 1992.

DAGOGO-JACK, Ibiayi; SHAW, Alice T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 2, p. 81–94, 8 fev. 2018.

DERYUGINA, Elena I.; QUIGLEY, James P. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. **Histochemistry and cell biology**, v. 130, n. 6, p. 1119–30, dez. 2008.

DIAS-CARVALHO, Ana *et al.* A Clinically Relevant Dosage of Mitoxantrone Disrupts the Glutathione and Lipid Metabolic Pathways of the CD-1 Mice Brain: A Metabolomics Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 17, p. 13126, 23 ago. 2023.

DOYLE, L. Austin *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 26, p. 15665–15670, 22 dez. 1998.

DU, Ting *et al.* Role of MRPs transporters in pharmacokinetics and intestinal toxicity of irinotecan. **Food and Chemical Toxicology**, v. 182, p. 114171, dez. 2023.

DUAN, Chunyan *et al.* Overcoming Cancer Multi-drug Resistance (MDR): Reasons, mechanisms, nanotherapeutic solutions, and challenges. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 162, p. 114643, jun. 2023.

DUVIVIER, Laurent *et al.* Linking ABC transporters to the hallmarks of cancer. **Trends in Cancer**, v. 10, n. 2, p. 124–134, fev. 2024.

EJENDAL, K. F.; HRYCYNA, C. A. Multidrug Resistance and Cancer: The Role of the Human ABC Transporter ABCG2. **Current Protein & Peptide Science**, v. 3, n. 5, p. 503–511, 1 out. 2002.

EVISON, Benny J. *et al.* Mitoxantrone, More than Just Another Topoisomerase II Poison. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, n. 2, p. 248–299, 19 mar. 2016.

FAN, Jingyi *et al.* ABC transporters affects tumor immune microenvironment to regulate cancer immunotherapy and multidrug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 66, p. 100905, jan. 2023.

FIDLER, I. J. Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis. **Nature New Biology**, v. 242, n. 118, p. 148–149, abr. 1973.

FIDLER, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. **Cancer research**, v. 35, n. 1, p. 218–24, jan. 1975.

FROMM, Martin F. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 8, p. 423–429, ago. 2004.

GEORGE, Anthony M. ABC Transporters 45 Years On. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 23, p. 16789, 27 nov. 2023.

GOTTESMAN, Michael M.; FOJO, Tito; BATES, Susan E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP–dependent transporters. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, 1 jan. 2002.

GYÖNGY, Zsuzsanna *et al.* Nucleotide binding is the critical regulator of ABCG2 conformational transitions. **eLife**, v. 12, 10 fev. 2023.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HE, Ji *et al.* Pleiotropic Roles of ABC Transporters in Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3199, 21 mar. 2021.

HERRMANN, Anne; MOSS, Diana; SÉE, Violaine. The Chorioallantoic Membrane of the Chick Embryo to Assess Tumor Formation and Metastasis. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 97–105.

HOLOHAN, Caitriona *et al.* Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 24 out. 2013.

HONORAT, Mylène *et al.* MBL-II-141, a chromone derivative, enhances irinotecan (CPT-11) anticancer efficiency in ABCG2-positive xenografts. **Oncotarget**, v. 5, n. 23, p. 11957–11970, 15 dez. 2014.

JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 455, n. 1, p. 152–162, nov. 1976.

KARAGIANNIS, George S.; CONDEELIS, John S.; OKTAY, Maja H. Chemotherapy-induced metastasis: mechanisms and translational opportunities. **Clinical & experimental metastasis**, v. 35, n. 4, p. 269–284, abr. 2018.

KHUNWEERAPHONG, Narakorn; STOCKNER, Thomas; KUHLER, Karl. The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13767, 23 out. 2017.

KNUTSEN, T. *et al.* Amplification of 4q21-q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 27, n. 1, p. 110–6, jan. 2000.

KOMATSU, Aoi; HIGASHI, Yuya; MATSUMOTO, Kotaro. Various CAM tumor models. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 37–57.

KWON, Insu *et al.* Prolonged Endurance Exercise Adaptations Counteract Doxorubicin Chemotherapy-Induced Myotoxicity in Mice. **Applied Sciences**, v. 12, n. 7, p. 3652, 5 abr. 2022.

LECERF-SCHMIDT, Florine *et al.* ABCG2: Recent Discovery of Potent and Highly Selective Inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 9, p. 1037–1045, 4 jun. 2013.

LUQMANI, Y. A. Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. **Medical Principles and Practice**, v. 14, n. Suppl. 1, p. 35–48, 2005.

MARQUES, Andreza Viviany Lourenço *et al.* The association of ABC proteins with multidrug resistance in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* Elsevier B.V., , 1 fev. 2025.

**MINISTÉRIO DA SAÚDE Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) 6ª edição revista e atualizada. [S.l.: S.n.]**

MIYAKE, K. *et al.* Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. **Cancer research**, v. 59, n. 1, p. 8–13, 1 jan. 1999.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MURIITHI, Wanjiru *et al.* ABC transporters and the hallmarks of cancer: roles in cancer aggressiveness beyond multidrug resistance. **Cancer Biology and Medicine**, v. 17, n. 2, p. 253–269, 2020.

OLIVEIRA, Ronaldo Figueira de *et al.* Evaluation of the antitumoral effects of the mesoionic compound MI-D: Implications for endothelial cells viability and angiogenesis inhibition. **Chemico-Biological Interactions**, v. 387, p. 110796, jan. 2024.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a mouse model for human melanoma. **Current protocols in immunology**, v. Chapter 20, p. Unit 20.1, maio 2001.

ÖZVEGY, Csilla *et al.* Functional Characterization of the Human Multidrug Transporter, ABCG2, Expressed in Insect Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 1, p. 111–117, jul. 2001.

PILOTTO HEMING, Carlos *et al.* P-glycoprotein and cancer: what do we currently know? **Heliyon**, v. 8, n. 10, p. e11171, out. 2022.

PIRES, Amanda do Rocio Andrade *et al.* New, highly potent and non-toxic, hormone inhibitors of the human breast cancer resistance protein ABCG2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 122, p. 291–301, out. 2016.

POTTEZ, Marine *et al.* Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice. **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e0206693, 2018.

RABINDRAN, S. K. *et al.* Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. **Cancer research**, v. 58, n. 24, p. 5850–8, 15 dez. 1998.

REID, Glen *et al.* Characterization of the Transport of Nucleoside Analog Drugs by the Human Multidrug Resistance Proteins MRP4 and MRP5. **Molecular Pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 1094–1103, maio 2003

RIBATTI, Domenico *et al.* Chorioallantoic membrane capillary bed: A useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. **The Anatomical Record**, v. 264, n. 4, p. 317–324, 25 dez. 2001.

RIBATTI, Domenico. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Reproductive Toxicology**, v. 70, p. 97–101, jun. 2017.

RIBATTI, Domenico. The chick embryo chorioallantoic membrane patient-derived xenograft (PDX) model. **Pathology - Research and Practice**, v. 243, p. 154367, mar. 2023.

ROBERTS, R. L. *et al.* ABCG2 loss-of-function polymorphism predicts poor response to allopurinol in patients with gout. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 17, n. 2, p. 201–203, 26 mar. 2017.

ROBEY, R. W. *et al.* Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 7, n. 1, p. 145–52, jan. 2001.

ROBEY, Robert W. *et al.* Pheophorbide a Is a Specific Probe for ABCG2 Function and Inhibition. **Cancer Research**, v. 64, n. 4, p. 1242–1246, 15 fev. 2004.

ROBEY, Robert W. *et al.* ABCG2: A perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 1, p. 3–13, jan. 2009.

ROBEY, Robert W. *et al.* Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 7, p. 452–464, 11 jul. 2018.

SANTOS, Marceli de Oliveira *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.

SENTEBANE, Dimakatso Alice *et al.* The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, 21 jul. 2017.

SIEGEL, Rebecca L.; GIAQUINTO, Angela N.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2024. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 1, p. 12–49, 17 jan. 2024.

TAYLOR, Nicholas M. I. *et al.* Structure of the human multidrug transporter ABCG2. **Nature**, v. 546, n. 7659, p. 504–509, 29 jun. 2017.

TEIMOURI, Fatemeh; NIKFAR, Shekoufeh; ABDOLLAHI, Mohammad. Efficacy and side effects of dacarbazine in comparison with temozolomide in the treatment of malignant melanoma. **Melanoma Research**, v. 23, n. 5, p. 381–389, out. 2013.

THOMAS, Christoph; TAMPÉ, Robert. Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters. **Annual Review of Biochemistry**, v. 89, n. 1, p. 605–636, 20 jun. 2020.

TIMIS, Tanase *et al.* Pathology and Molecular Biology of Melanoma. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 45, n. 7, p. 5575–5597, 30 jun. 2023.

TINHOFER, Ingeborg; BRAUNHOLZ, Diana; KLINGHAMMER, Konrad. Preclinical models of head and neck squamous cell carcinoma for a basic understanding of cancer biology and its translation into efficient therapies. **Cancers of the Head & Neck**, v. 5, n. 1, p. 9, 23 dez. 2020.

VALDAMERI, G.; ROCHA, M. E. M.; WINNISCHOFER, S. M.; DI PIETRO, A.; GAUTHIER, C.; BOUMENDJEL, A.; GENOUX-BASTIDE, E. Uso do MBL-II-141 como um inibidor específico do transportador ABCG2. Brasil: INPI, patente BR 1020120265745, depositada em 17 out. 2012.

VALDAMERI, Glaucio *et al.* Substituted Chromones as Highly Potent Nontoxic Inhibitors, Specific for the Breast Cancer Resistance Protein. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 966–970, 26 jan. 2012.

VALDAMERI, Glaucio *et al.* Characterization of Potent ABCG2 Inhibitor Derived from Chromone: From the Mechanism of Inhibition to Human Extracellular Vesicles for Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 4, p. 1259, 17 abr. 2023.

VALDAMERI, G.; VALDAMERI, V. R. M.; DUTRA, J. P.; ARAYA, M. I. R.; ROSSI, I. V.



Método de obtenção de vesículas extracelulares de células sanguíneas e plasma humano para perfusão de fármacos e usos. Brasil: INPI, patente BR 102024003355-8, depositada em 21 fev. 2024, concedida em 15 jul. 2025.

WEIDNER, Lora D. *et al.* The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 354, n. 3, p. 384–393, set. 2015.

WIJNHOLDS, Jan *et al.* Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. **Nature Medicine**, v. 3, n. 11, p. 1275–1279, nov. 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (OMS). *Cancer*. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer>. Acesso em: 14 nov. 2025.

WU, Ri-Hong *et al.* 3'-epi-12 $\beta$ -hydroxyfroside induces autophagic degradation of ABCG2 to overcome drug resistance in lung cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 187, p. 118085, jun. 2025.

XU, Junkang *et al.* Oligomerization Domain of the Multidrug Resistance–Associated Transporter ABCG2 and Its Dominant Inhibitory Activity. **Cancer Research**, v. 67, n. 9, p. 4373–4381, 1 maio 2007.

YANG, C. J. *et al.* Cross-resistance to camptothecin analogues in a mitoxantrone-resistant human breast carcinoma cell line is not due to DNA topoisomerase I alterations. **Cancer research**, v. 55, n. 18, p. 4004–9, 15 set. 1995.

ZATTONI, Ingrid Fatima *et al.* A new porphyrin as selective substrate-based inhibitor of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). **Chemico-biological interactions**, v. 351, p. 109718, 5 jan. 2022.

ZATTONI, Ingrid Fatima *et al.* Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Functional inhibitors and expression modulators. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 237, p. 114346, jul. 2022.

ZHANG, Wei *et al.* ABCG2-overexpressing H460/MX20 cell xenografts in athymic nude mice maintained original biochemical and cytological characteristics. **Scientific reports**, v. 7, p. 40064, 6 jan. 2017.

ZHANG, Shaosen *et al.* Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 149, 19 jun. 2024.

## APÊNDICE – Comitê de Ética: Avaliação de um inibidor do transportador ABCG2 Cromona 4a (C4a) em associação com quimioterápicos antineoplásicos em modelo murino de metástase



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1626

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.045208/2024-65

**APROVADO/APPROVAL:** 10/09/2024 – R.O. 08/2024

**TÍTULO:** Avaliação de um inibidor do transportador ABCG2 Cromona 4a (C4a) em associação com quimioterápicos antineoplásicos em modelo murino de metástase.

**TITLE:** Evaluation of an inhibitor of the ABCG2 transporter Chromone 4a (C4a) in association with antineoplastic chemotherapeutics in a murine model of metastasis.

**AUTORES/AUTHORS:** Ciro Alberto De Oliveira Ribeiro.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Análises Clínicas (Ciências da Saúde).

**Coordenador(a) da CEUA**



Documento assinado eletronicamente por **ANGELA CRISTINA DA FONSECA DE OLIVEIRA, INSTITUCIONAL**, em 17/09/2024, às 14:21, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **JANAINA MENEZES ZANOVELI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/09/2024, às 15:58, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **7056591** e o código CRC **840A1458**.