

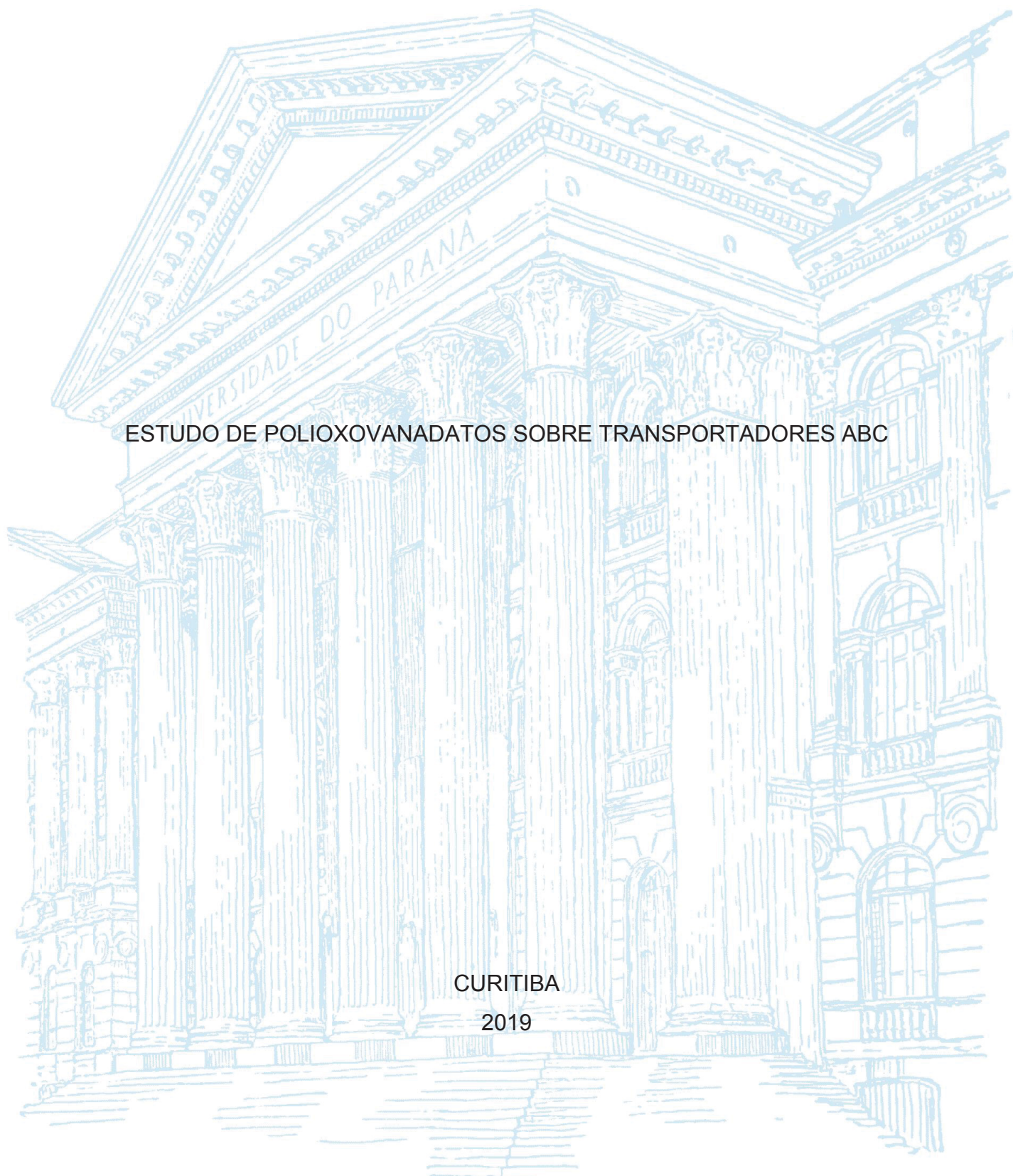
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISELE ALVES DE ANDRADE

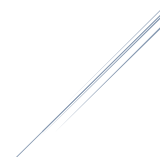
ESTUDO DE POLIOXOVANADATOS SOBRE TRANSPORTADORES ABC

CURITIBA

2019



GISELE ALVES DE ANDRADE



ESTUDO DE POLIOXOVANADATOS SOBRE TRANSPORTADORES ABC

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

Orientador: Prof. Dr. Glaucio Valdameri

Coorientadora: Profa. Dra. Giovana Gioppo Nunes

CURITIBA

2019

Andrade, Gisele Alves de

Estudo de polioxovanadatos sobre transportadores ABC [recurso eletrônico] /
Gisele Alves de Andrade – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná,
2019.

Orientador: Professor Dr. Glaucio Valdameri

Coorientadora: Professora Dra. Giovana Gioppo Nunes

1. Câncer. 2. Transportadores ABC. 3. Glicoproteína-P. 4. Inibidores.
5. Polioxovanadatos. I. Valdameri, Glaucio. II. Nunes, Giovana Gioppo.
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1901

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GISELE ALVES DE ANDRADE** intitulada: **Estudo de polioxovanadatos sobre transportadores ABC**, sob orientação do Prof. Dr. GLAUCIO VALDAMERI, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre 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, 26 de Agosto de 2019.

GLAUCIO VALDAMERI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

VIVIAN ROTUNO MOURE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

FABIANE GOMES DE MORAES REGO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Luiz Fernando, por ter sido meu ponto de apoio, meu motivo de sorriso e por me fazer acreditar que era possível.

Ao meu irmão, Maurício, por ser tão gentil e me ouvir.

A minha mãe, Cleonice, pelas palavras doces, e por toda a ajuda.

A Paula, minha amiga-irmã, por me incentivar a fazer mestrado.

Ao meu excelente orientador, Glaucio, que foi extremamente compreensivo e me guiou até o final.

A minha coorientadora, Giovana, que teve imensa boa vontade em todos os momentos.

Aos meus amigos do laboratório Isadora, Diogo, Ingrid, Diego, Ana Luiza e Melanie por toda a ajuda, companheirismo e momentos felizes.

Ao Diogo, por fazer toda a bateria inicial de ensaios, antes que meu mestrado começasse, e também por mostrar toda a rotina laboratorial e me treinar.

A Ingrid, por me auxiliar com a produção do resultado do anticorpo conformacional 17F9.

Aos professores Fabiane e Geraldo, por cederem estrutura, equipamentos e vidraria para nossos experimentos.

A Kahoana e Juliana, por me receberem de braços abertos, e me ajudarem sempre que precisei.

A Vivian, por ajudar com os resultados mesmo quando estive tão ocupada.

Agradeço aos meus amigos que não fazem parte do laboratório, mas que foram muito importantes para mim neste tempo.

A CAPES, pela bolsa, ao CNPq e Fundação Araucária por financiarem este projeto.

Por fim, agradeço ao Programa de Ciências Farmacêuticas, por me proporcionar essa chance de pesquisa.



“O vento é o mesmo, mas a sua resposta é diferente em cada folha. Somente a árvore seca fica imóvel entre borboletas e pássaros.”

Cecilia Meireles

RESUMO

A resistência a multidrogas (MDR) continua sendo um dos maiores desafios no tratamento do câncer. A superexpressão de transportadores ABC em células neoplásicas é considerada como principal responsável pela MDR. Neste trabalho foi avaliado o potencial de alguns polioxovanadatos (**NaV₁₀**, **NicoV₁₀**, **IsoV₁₀**, **V₁₄**, **V₁₅** e **V₁₈**) como inibidores dos três principais transportadores ABC implicados na MDR: glicoproteína P (P-gp), ABCG2 e MRP1. Os polioxidovanadatos promoveram uma inibição específica do transporte de diferentes substratos mediado pela P-gp. **NaV₁₀**, **V₁₄**, **V₁₅** e **V₁₈** mostraram uma inibição completa (100%) na concentração de 50 µM, diferente do NicoV₁₀ e IsoV₁₀, que mostraram uma inibição parcial (~50%) em 50 µM. Os melhores inibidores da P-gp foram o **NaV₁₀** e o **V₁₈**, com valores de IC₅₀ de 25,4 ± 7,9 e 22,7 ± 3,6 µM, respectivamente. A inibição da P-gp foi confirmada utilizando diferentes substratos, incluindo rodamina 123, mitoxantrona e Hoechst 33342. Um ensaio de viabilidade celular revelou que tanto o **NaV₁₀** como o **V₁₈** não são transportados pela P-gp. Este resultado foi confirmado por um ensaio de inibição realizado após lavar duas vezes as células com PBS para remoção dos compostos do meio de cultivo. Para ambos os compostos, **NaV₁₀** e o **V₁₈**, a potência de inibição foi similar antes e após as etapas de lavagem. Além disso, a inibição da P-gp foi dependente do tempo, sugerindo que esses compostos atravessam a membrana celular lentamente. **NaV₁₀** e **V₁₈** mostraram uma inibição não competitiva e diferentes sítios de ligação, uma vez que o efeito promovido pelo **NaV₁₀** na ligação do anticorpo conformacional 17F9 foi diferente do efeito promovido pelo **V₁₈**. Um polioxovanadato associado com a rodamina B (**RhoBV₁₀**) foi utilizado para confirmar que estes compostos atravessam a membrana plasmática e se acumulam no interior das células. Estes resultados sugerem que os polioxovanadatos representam uma classe promissora de compostos solúveis em água que podem ser usados como inibidores seletivos da P-gp em futuros testes pré-clínicos.

Palavras-chave: câncer, transportadores ABC, glicoproteína-P, inibidores e polioxovanadatos

ABSTRACT

Multidrug resistance (MDR) remains one of the greatest challenges in cancer treatment. Overexpression of ABC transporters in cancer cells has been shown to be the major responsible for MDR. Here, we evaluate the potential of polyoxovanadates compounds (**NaV₁₀**, **NicoV₁₀**, **IsoV₁₀**, **V₁₄**, **V₁₅** and **V₁₈**) as inhibitors of the three main ABC transporters implicated in MDR: P-glycoprotein (P-gp), ABCG2 and MRP1. The polyoxovanadates were selective to inhibit P-gp-mediated transport of different substrates. **NaV₁₀**, **V₁₄**, **V₁₅** and **V₁₈** showed a complete inhibition (100%) at 50 μ M, differently of **NicoV₁₀** and **IsoV₁₀**, that showed an incomplete inhibition (~50%) at 50 μ M. The best P-gp inhibitors were **NaV₁₀** and **V₁₈**, with IC₅₀ of 25.4 ± 7.9 and 22.7 ± 3.6 μ M, respectively. The P-gp inhibition was confirmed using different substrates, including rhodamine 123, mitoxantrone and Hoechst 33342. A cell viability assay revealed that both **NaV₁₀** and **V₁₈** are not transported by P-gp. This result was confirmed by an inhibition assay carried out after wash two times the cells with PBS for removal of compounds from culture media. For both **NaV₁₀** and **V₁₈** the inhibition potency was the same before and after the washing steps. In addition, the P-gp inhibition was time dependent, suggesting that these compounds cross the cell membrane slowly. **NaV₁₀** and **V₁₈** showed a non-competitive inhibition and different binding sites, since the effect promoted by **NaV₁₀** on binding of the conformational antibody 17F9 was different from the effect promoted by **V₁₈**. A polyoxometalate compound containing rhodamine B (**RhoBV₁₀**) was used to confirm that these compounds cross the membrane and accumulate inside the cells. These data suggest that polyoxovanadates-containing compounds are a promising class of water-soluble drugs that can be used as selective P-gp inhibitors in future pre-clinical tests.

Keywords: cancer, ABC transporters, P-glycoprotein, inhibitors and polyoxovanadates.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURA DA P-gp	16
FIGURA 2. ESTRUTURA DA MRP1	17
FIGURA 3. ESTRUTURA DE ABCG2.....	19
FIGURA 4. ESTRUTURA QUÍMICA DO FOSFATO E ORTOVANADATO. MECANISMO DE TRANSPORTE DE SUBSTRATOS POR TRANSPORTADORES ABC.....	22
FIGURA 5. SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE SUBSTRATOS E INIBIDORES NA P-gp	24
FIGURA 6. REPRESENTAÇÕES DE INTERAÇÃO DO VANÁDIO	28
FIGURA 7. ESTRUTURAS DE COMPOSTOS DE VANADIO COM ATIVIDADE BIOLOGICA.....	30
FIGURA 8. ESPECIES MAIS COMUNS DE DISSOCIAÇÃO DE OXOVANÁDIO EM MEIO AQUOSO	31
FIGURA 9. FORMAS REPRESENTATIVAS DO ÂNION DECAVANADATO...	31
FIGURA 10. A INTERAÇÃO DO DECAVANADATO COM A MutS DE <i>E. coli</i> .	33
FIGURA 11. MODELO DE INTERAÇÃO DO ANION ((Hmet) ₂ V ₁₀) COM A MEMBRANA.....	34
FIGURA 12. EXEMPLOS DE POLIOXOVANADATOS CONTENDO ÂNIOS ENCAPSULADOS.....	35
FIGURA 13. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DE ORTOVANADATO (Na₃VO₄) E DO DECAVANADATO DE SÓDIO (NaV₁₀) SOBRE OS TRANSPORTADORES ABC	44
FIGURA 14. DIAGRAMA ORTEP DE NicoV₁₀ E IsoV₁₀	45
FIGURA 15. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DE NicoV₁₀ , IsoV₁₀ E NaV₁₀ FRENTE A P-GP	46
FIGURA 16. CURVAS DE IC ₅₀ DE INIBIÇÃO DOS DECAVANADATOS NaV₁₀ , NicoV₁₀ E IsoV₁₀ SOBRE A P-gp	48
FIGURA 17. DIAGRAMA ORTEP DE V₁₄ , V₁₅ E V₁₈	49
FIGURA 18. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO Na₃Vo₄ , NaV₁₀ , V₁₄ , V₁₅ , V₁₈ SOBRE OS TRANSPORTADORES ABC	50

FIGURA 19. CURVAS DE IC ₅₀ DE INIBIÇÃO DO V₁₄ , V₁₅ E V₁₈ SOBRE A P-gp	53
FIGURA 20. ESTRUTURA QUÍMICA DA MITOXANTRONA E CURVAS DE IC ₅₀ DE NaV₁₀ E V₁₈ COM ESSE SUBSTRATO.....	55
FIGURA 21. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NaV₁₀ E V₁₈ FRENTE A P-gp.....	56
FIGURA 22. INIBIÇÃO DA P-gp AO LONGO DO TEMPO E ENSAIO DE LAVAGEM.....	58
FIGURA 23. GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK PARA NaV₁₀ E V₁₈	60
FIGURA 24. O EFEITO DOS POLIOXOVANADATOS NaV₁₀ E V₁₈ SOBRE A LIGAÇÃO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 17F9 NA P-gp.....	61
FIGURA 25. O COMPORTAMENTO DOS SUBSTRATOS FLUORESCENTES FRENTE A P-gp.....	62
FIGURA 26. O DIAGRAMA ORTEP DA ESTRUTURA DE RhoBV₁₀	63
FIGURA 27. O ACÚMULO CELULAR DE RhoB E RhoBV₁₀	64
FIGURA 28. A CAPACIDADE DE INIBIR O TRANSPORTE DE RODAMINA 123 (Rho123) E MITOXANTRONA (MTX) UTILIZANDO NaV₁₀ OU RhoBV₁₀ . 65	
FIGURA 29. MICROSCOPIA CONFOCAL COM AS CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM P-gp EXPOSTAS A RhoB, RhoBV₁₀ E RhobV₁₀ + Rho123.....	66
FIGURA 30. ESTRUTURA DOS OLIGOMEROS DE VANÁDIO.....	66

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	O CÂNCER E A RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS	14
2.2	TRANSPORTADORES ABC.....	15
2.3	GLICOPROTEÍNA P (P-gp).....	16
2.4	PROTEINA 1 ASSOCIADA A RESISTÊNCIA A MULIPLAS DROGAS (MRP1)	17
2.5	ABCG2	18
2.6	FUNÇÕES DOS TRANSPORTADORES ABC.....	19
2.7	O PAPEL DA P-gp EM CÂNCER	20
2.8	A INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ATPase.....	21
2.9	SUBSTRATOS TRANSPORTADOS PELA P-gp	23
2.10	O USO DE INIBIDORES da P-gp.....	25
2.11	O VANÁDIO COMO METAL DE INTERESSE BIOLÓGICO E FAMACOLÓGICO	27
2.12	IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO ÂNION DECAVANADATO E OUTROS POLIOXOMETALATOS	30
3.	OBJETIVOS.....	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	36
4.	JUSTIFICATIVA.....	37
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1	POLIOXOVANADATOS UTILIZADOS	38
5.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	38
5.3	LINHAGENS CELULARES	38
5.4	CONDIÇÕES DE CULTIVO	39
5.5	IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DOS TRANSPORTADORES ABC (ABCG2, P-gp e MRP1).....	39
5.6	AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO E EFEITO SOBRE TRANSPORTE MEDIADO PELO TRANSPORTADOR P-GP ATRAVÉS DE ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	40

5.7	ENSAIOS DE LONGA DURAÇÃO	41
5.8	MICROSCOPIA CONFOCAL	41
5.9	LIGAÇÃO ANTICORPO CONFORMACIONAL 17F9.....	42
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1	INIBIÇÃO DOS TRAPORTADORES ABC PELO ORTOVANADATO <i>VERSUS</i> DECAVANADATO (Na₃VO₄ x NaV₁₀).....	43
6.2	INIBIÇÃO DA P-gp PELOS DECAVANADATOS: EFEITO DA PRESENÇA DE CÁTIONS ORGÂNICOS	45
6.3	EFEITO DA VARIAÇÃO DA TOPOLOGIA DOS POLIOXOVANADATOS	49
6.4	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA P-gp (IC ₅₀) PELOS POLIOXOVANADATOS DE VAIENCIA MISTA.....	52
6.5	AVALIAÇÃO DA MUDANÇA DO SUBSTRATO SOBRE O EFEITO DE INIBIÇÃO DA P-gp PELOS POLIOXOVANADATOS	54
6.6	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E AUSÊNCIA DE TRANSPORTE DE NaV₁₀ e V₁₈	56
6.7	POTENCIAL DE INIBIÇÃO DO NaV₁₀ E DO V₁₈ AO LONGO DO TEMPO	57
6.8	AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE INIBIÇÃO	59
6.9	SÍTIOS DE LIGAÇÃO DOS POLIOXOVANADATOS NA P-gp .	60
6.10	COMPORTAMENTO DA RODAMINA 123 E RODAMINA B SOBRE A P-gp.....	62
7.	CONCLUSÕES.....	68
8.	PERSPECTIVAS	69
9.	REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios no tratamento do câncer está relacionado com a resistência a múltiplas drogas (MDR). A MDR pode ocorrer por diversos fatores, entretanto, a principal causa está vinculada a superexpressão de transportadores ABC em células neoplásicas (STEINBICHLER *et al.*, 2019).

Os transportadores ABC são compostos basicamente por dois domínios transmembrana (TMDs) e dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBDs). Esses transportadores usam a energia de ligação e hidrólise de ATP para promover o transporte de substratos para fora das células (CHEN *et al.*, 2018). Esse transporte, diminui drasticamente o acúmulo intracelular de quimioterápicos em diferentes tipos de câncer. Cerca de 50% dos pacientes com câncer e que apresentam resistência ao tratamento superexpressam o transportador ABCB1, conhecido como glicoproteína-P (P-gp) (SUBRAMANIAN *et al.*, 2019). Mais de 20 diferentes drogas citotóxicas são substratos deste transportador, incluindo mitoxantrona, daunorrubicina e paclitaxel (NANAYAKKARA *et al.*, 2018). O segundo transportador ABC mais importante na MDR é o transportador ABCG2, também chamado de BCRP (*Breast Cancer Resistant Protein*) (HORSEY, KERR, 2016), seguido por MRP1 (*Multidrug Resistance Associated Protein 1*) (PATERNA *et al.*, 2018).

Para reverter a MDR mediada por transportadores ABC em diferentes tipos de câncer, a estratégia mais promissora é a inibição dessas proteínas. Apesar de recentes avanços na área, apenas poucas classes de compostos apresentaram um efeito promissor, tornando extremamente urgente e necessário a identificação de novos inibidores de transportadores ABC (CUI ET AL., 2019).

A proposta vislumbrou avaliar o efeito de polioxovanadatos como inibidores dos transportadores ABC. A escolha de polioxovanadatos foi baseada no fato que o ortovanadato de sódio é descrito como inibidor da atividade ATPase de transportadores ABC, por se ligar com alta afinidade ao sítio de ligação do fosfato inorgânico (Pi) nos NBDs, e que o **NaV₁₀** parece se ligar também ao sítio de Pi, ainda que não se saiba se os polioxovanadatos podem atravessar a membrana celular (PEZZA, VILLARREAL, MONTICH, ARGARAÑA, 2002).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O CÂNCER E A RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

De acordo com o *International Agency for Research on Cancer*, hoje a incidência de câncer é de cerca de 19 milhões de novos casos, com perspectiva de aumento para 29 milhões de novos casos anuais até 2040. A previsão é de cerca de 13 milhões de novos casos em mulheres e 16 milhões de novos casos em homens. Hoje existem cerca de 10 milhões de mortes anuais por câncer, e esse número deve aumentar progressivamente até aproximadamente 16 milhões de mortes anuais até 2040 (IARC, 2018).

Uma das maiores dificuldades relacionadas ao tratamento do câncer está vinculada a resistência. Muitos estudos demonstraram que à superexpressão de determinados genes e proteínas são os responsáveis pelo fenótipo de resistência, evidenciado pelo insucesso nas terapias (SZAKÁCS et al., 2006). Neste contexto, a resistência a múltiplas drogas (MDR) é o termo usado para se referir a resistência a diferentes classes de drogas. Essa resistência é comumente adquirida e resulta na ausência de resposta a drogas (PATERNA ET AL., 2018; SZAKÁCS ET AL., 2014).

Quando a quimioterapia é utilizada, o esperado é que, independente do mecanismo de ação, ocorra morte da célula neoplásica e regressão completa e permanente. Porém, em muitos casos as células não respondem de acordo com esse perfil, desenvolvendo o fenótipo de MDR. Esse fenótipo pode ser mediado por muitos mecanismos, dentre eles os principais são: (i) mudanças nos níveis de expressão de proteínas alvos dos agentes quimioterápicos, (ii) mutações nos alvos que diminuem a atividade do quimioterápico, (iii) modificações do metabolismo e alteração da sinalização apoptótica, (iv) aumento na tolerância celular aos danos causados pelos quimioterápicos, (v) redução do influxo de drogas que costumam penetrar na célula através de carreadores ou endocitose, acarretando em uma diminuição no acúmulo intracelular do quimioterápico e (vi) expressão de transportadores ABC (MARKMAN, REKECHENETSKIY, HOLLER, & LJUBIMOVA, 2013).

Dentre os mecanismos propostos para o surgimento da MDR, o aumento da expressão (superexpressão) de alguns transportadores da superfamília ABC é descrito como um dos principais fatores (GALLUZZI, VITALE, 2018; ROBEY ET AL., 2018; TAMAKI, IERANO, SZAKACS, ROBEY, BATES, 2011). O sucesso da quimioterapia está intimamente relacionado com a concentração intracelular ótima da droga. Assim, a presença de transportadores ABC em células de câncer promove o efluxo dos quimioterápicos reduzindo a concentração intracelular do fármaco para doses subclínicas, acarretando na falha do tratamento (FUKUDA, SCHUETZ, 2012).

2.2 TRANSPORTADORES ABC

A classificação dos transportadores ABC é feita de acordo com sua função. Em procaríotos os transportadores ABC são proteínas de transporte bilateral, ou seja, são observados importadores e exportadores. Contudo, em eucariotos apresentam função de transporte unilateral, sendo apenas exportadores de substratos (DEAN, HAMON, CHIMINI, 2001; DEELEY, COLE, 2006; JIANG, CHEN, GU, ZHANG, 2018).

A unidade funcional mínima dos transportadores ABC consiste em quatro domínios: dois domínios NBDs (domínios de ligação de nucleotídeos) e dois domínios TMDs (domínios transmembrana). Os domínios voltados para o interior celular, os NBDs, contêm em sua sequência os motivos Walker A e Walker B (Walker et al, 1982), bem como uma pequena sequência conservada chamada de assinatura ABC, ou assinatura C, que é típica dos membros da superfamília ABC. Embora existam diferenças entre os NBDs, os motivos Walker A, B e a assinatura C são conservados em toda a família de transportadores ABC. Por esse motivo são chamados de ABC, de ATP *binding cassette* (BRANCH, 2003; G. CHANG, 2003; JONES, GEORGE, 2005).

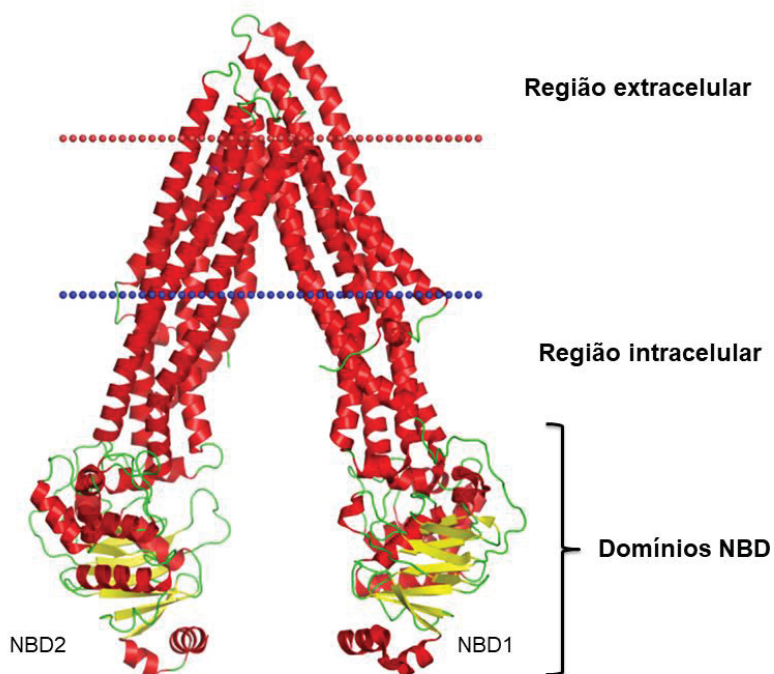
Os TMDs permeiam a membrana plasmática e são responsáveis pela ligação clássica de substratos e inibidores. A diferença entre os transportadores ABC se encontra justamente na estrutura modular e no número de TMDs, o que culmina em especificidades diversas aos substratos por eles transportados (AMBUDKAR ET AL., 1992; DEELEY, COLE, 2006; ESSER ET AL., 2017; ROBEY ET AL., 2018A; SZAKACS ET AL., 2006).

2.3 GLICOPROTEÍNA P (P-gp)

A glicoproteína-P (P-gp) foi o primeiro transportador ABC descoberto e relacionado com o fenótipo de resistência, conseqüentemente esse é o transportador ABC melhor caracterizado. Foi descrita pela primeira vez em 1976 como uma glicoproteína de superfície, presente na membrana citoplasmática e associada ao fenótipo de resistência (JULIANO & LING, 1976). A P-gp possui 1280 resíduos de aminoácidos e peso molecular 170 kDa (FIGURA 1). Em humanos é codificada pelo gene *MDR1/ABCB1*, localizados no cromossomo 7 (ESSER et al., 2017).

Sua expressão acontece em uma única cadeia contendo duas porções homólogas de igual comprimento (610 aminoácidos), unidas por uma região de ligação de 60 resíduos de aminoácidos. Cada metade homóloga corresponde a 6 hélices transmembrana hidrofóbicas e um NBD hidrofílico (FIGURA 1), voltado para o interior celular (KIM, SHIN, YOO, SHIN, 2018).

FIGURA 1. ESTRUTURA DA P-GP



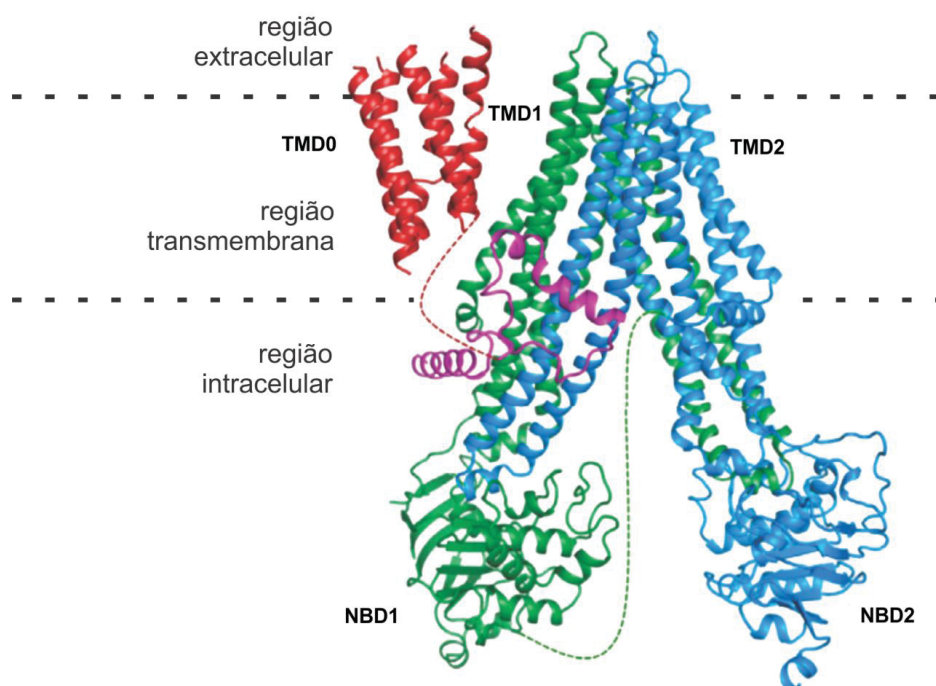
FONTE: (NICKLISCH et al., 2016).

NOTA: Estrutura da P-gp de *Mus Musculus* co-cristalizada com PBDE (éter de difenilico polibromado)-100. As linhas pontilhadas vermelhas e azuis delimitam a região transmembrana. Abaixo da linha azul temos os dois NBDs. Depósito PDB - 4XWK 28-01-2015.

2.4 PROTEINA 1 ASSOCIADA A RESISTÊNCIA A MUIPLAS DROGAS (MRP1)

A subfamília de proteínas MRP foi descoberta em 1992, quando pesquisadores descobriram um segundo transportador ABC associado com a MDR, que mais tarde passou a ser chamada de MRP1 (*multidrug associated protein 1*). Esse transportador é codificado pelo gene *ABCC1*. Seu peso molecular é de 190 kDa e é constituída por 1531 resíduos de aminoácidos. A proteína é formada por 2 TMDs (TMD1 e TMD2), 2 NBDs e um terceiro TMD chamado TMD0 (amino-terminal) (FIGURA 2) (DEGORTER, CONSEIL, DEELEY, CAMPBELL, COLE, 2008; PATERNA *et al.*, 2018).

FIGURA 2. ESTRUTURA DA MRP1



FONTE: (JOHNSON, CHEN, 2017).

NOTA: Estrutura da MRP1 (PDB 5UJ9) de *Bos taurus*. As linhas pontilhadas vermelhas e azuis delimitam a região transmembrana. Abaixo da linha azul temos os dois NBDs. A sequência de bMRP1 é 91% similar a hMRP1 (MRP1 humana).

MRP1 é um transportador fisiologicamente expresso em diferentes órgãos, encontrado principalmente no fígado, no cérebro, rins e intestino, mas existem outros tecidos onde também é expresso. Existem poucos inibidores capazes de modular a atividade de MRP1, diferentemente da P-gp, que

existem inibidores de alta eficiência que já chegaram à fase clínica (CHEN ET AL., 2018; DEELEY, COLE, 2006).

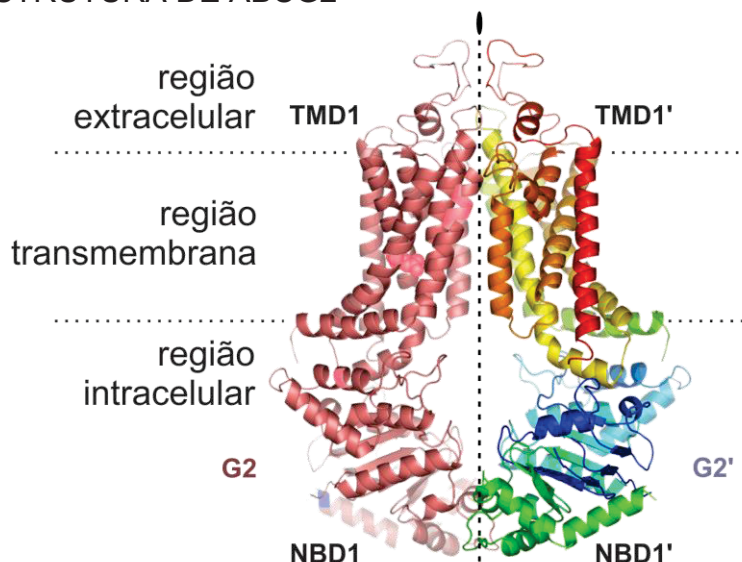
Recentemente, evidenciou-se a superexpressão de MRP1 em uma vasta e diversa relação de malignidades, destacando-se os quadros clínicos de câncer pulmonar, leucemia além de carcinomas cerebrais, pancreáticos, de cólon e vesícula biliar. Ainda, o transportador foi clonado em diversas linhagens celulares não humanas e não tumorais, confirmando a relação entre sua presença e o fenômeno de MDR (STEFAN; WIESE, 2019).

2.5 ABCG2

Descoberto em 1998, o transportador ABCG2 pertence a subfamília G. Ele foi descoberto de forma concomitante e independente por 3 laboratórios de pesquisa. Um grupo de pesquisadores observou o fenótipo de resistência a quimioterapia em um tumor de mama, que não expressava P-gp e MRP1. Por isso, a proteína foi chamada primeiramente de BCRP (*Breast cancer Resistance Protein*) (DOYLE et al., 1998). Os outros 2 grupos identificaram duas proteínas de sequência muito semelhante. Um grupo identificou a proteína em linhagens de carcinoma de cólon humano resistentes a mitoxantrona, por isso a chamaram de MXR (MIYAKE et al., 1999). O terceiro grupo identificou a proteína na placenta, nomeando de ABCP (ALLIKMETS, SCHRIML, HUTCHINSON, ROMANO-SPICA, DEAN, 1998).

O transportador ABCG2 é uma glicoproteína de 655 aminoácidos, com 72 kDa de peso molecular (HEGEDUS ET AL., 2002). ABCG2 tem a particularidade de não ser um transportador completo, sendo considerado um meio transportador, ou seja, é necessário que ocorra a dimerização das subunidades para torna-se uma estrutura completa e ativa (FIGURA 3) (ALLEN ET AL., 2002). Assim, trata-se de um transportador cuja configuração é formada por apenas um TMD e um NBD unidos em uma única cadeia polipeptídica. Sua unidade funcional, um homodímero estabilizado por ligações dissulfeto, possui massa molecular de aproximadamente 144 kDa (FIGURA 3) (TAYLOR et al., 2017).

FIGURA 3. ESTRUTURA DE ABCG2



FONTE: Adaptado (TAYLOR ET AL., 2017).

NOTA: Estrutura tridimensional da unidade funcional do transportador ABCG2, resolvida por crio-microscopia eletrônica de única partícula com resolução de 3.8 Å. Os monômeros inativos de ABCG2 encontram-se representados por G2 e G2' e destacados por cores distintas, evidenciando a simetria entre os mesmos e a necessidade do processo de homodimerização para que a proteína possua funcionalidade biológica.

2.6 FUNÇÕES DOS TRANSPORTADORES ABC

Pelo fato de serem uma superfamília de proteínas presentes em todos os reinos (Archaea, Eukarya e Bacteria), os transportadores ABC apresentam uma variedade de funções biológicas. Transportadores bacterianos caracteristicamente são importadores de nutrientes, mas existem exportadores de diversas substâncias (metabolitos, peptídeos e xenobióticos), ainda, existem as proteínas ABC que não possuem TMDs, envolvidas em processo de reparo e tradução, e por último, os transportadores ABC que atuam como canais iônicos (FORD; BEIS, 2019).

Os transportadores ABC são capazes de transportar uma grande variedade de substratos, normalmente moléculas hidrofóbicas. Entretanto, os substratos dos transportadores ABC apresentam estruturas não relacionadas, impossibilitando a previsão se a molécula será transportada por um

transportador específico, por mais de um transportador, ou se não será transportada (ECKFORD, SHAROM, 2009; EIDE, DRUKER, 2017; LUGO, SHAROM, 2014).

Os transportadores ABC possuem importantes funções fisiológicas relacionadas com processos de detoxificação e proteção celular, atuando na remoção de metabolitos citotóxicos. A P-gp, por exemplo, encontra-se expressa em barreiras biológicas como a hematoencefalica e hematoplacentaria, mas também em órgãos como rins e fígado, e também no trato gastrointestinal, além do sistema imunológico e da pele (TAMAKI *et al.*, 2011). MRP1 também encontra-se amplamente distribuída no organismo, exercendo seus papéis de quimioproteção principalmente em rins, intestino e cérebro (DEELEY, COLE, 2006). ABCG2 é altamente expressa na placenta, intestino, cólon e reto, no fígado e também no cérebro, embora também possa ser encontrado em outros órgãos como rim, próstata, ovários e útero. ABCG2 também está presente no sistema nervoso central, locais onde exerce as funções de quimioproteção (LIAO *et al.*, 2018).

2.7 O PAPEL DA P-gp EM CÂNCER

Por apresentar funções de proteção celular, a proteína P-gp encontra-se expressa em diferentes tecidos do organismo, no entanto, em células cancerosas existe uma superexpressão do transportador como, por exemplo, em carcinomas de ovário, pulmão e melanomas multirresistentes (TAMAKI ET AL., 2011). É importante ressaltar que a P-gp não está superexpressa em apenas em formas de câncer relacionadas aos tecidos onde se expressa de maneira fisiológica. Ainda, a superexpressão da P-gp pode acontecer concomitante com outros transportadores ABC, como é o caso de tumores de rim e fígado (ROBEY *et al.*, 2018).

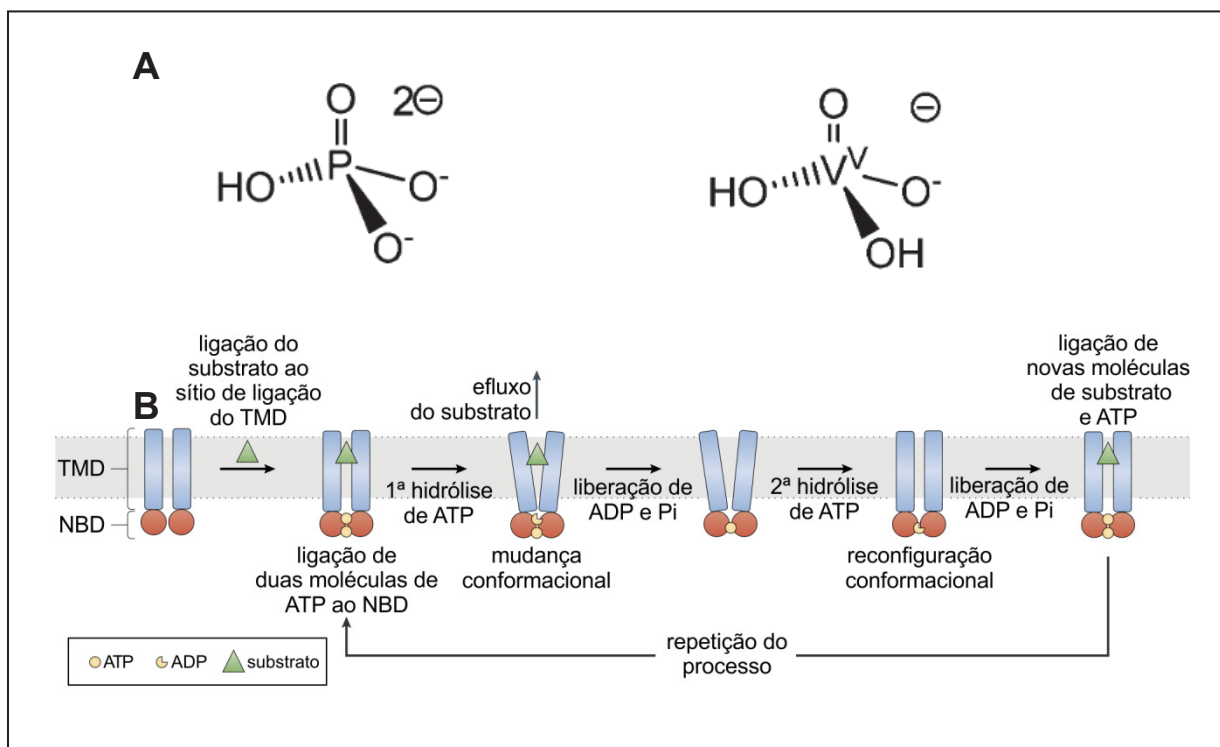
Uma vez superexpressa, a P-gp promove o transporte dos quimioterápicos. Esse efeito ocorre de forma promíscua, pois uma vez que a célula de câncer começa a expressar o transportador, torna-se resistente a diferentes quimioterápicos (L. GALLUZZI *et al.*, 2012; ROBEY *et al.*, 2018).

2.8 A INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ATPase

Na década de 1970, concomitante com a descoberta do transportador P-gp e seu mecanismo de hidrólise de ATP, Cantley e colaboradores exploraram a semelhança entre os íons ortovanadato e fosfato (FIGURA 4A). Essa analogia estrutural levou o grupo a testar a interação do ortovanadato frente à atividade ATPase Na⁺/K⁺, utilizando ATP e membranas purificadas provenientes de modelos animais (CANTLEY ET AL., 1977). Embora o ortovanadato promova a inibição da atividade ATPase em diferentes tipos de transportadores, estudos recentes têm demonstrado que ele tem certa seletividade para transportadores ABC.

A ligação de ATP, ADP e fosfato inorgânico (Pi) em transportadores ABC ocorre em locais específicos nos NBDs (SHAROM, 2011). Como representado na figura 4B, A força motriz para o transporte de substratos é iniciada por uma mudança conformacional nos NBDs. A ligação de ATP promove a rotação de domínios estruturais dos NBDs e a formação de dímeros fechados que englobam duas moléculas de ATP. A hidrólise de ATP e a liberação de ADP e Pi promovem a abertura do dímero. A ligação de ATP pelos NBDs e a formação do dímero na conformação fechada induzem mudanças conformacionais substanciais nos TMDs, permitindo a liberação dos substratos para fora das células (ROBEY *et al.*, 2018; ROSENBERG *et al.*, 2001).

FIGURA 4. ESTRUTURA QUÍMICA DO FOSFATO E ORTOVANADATO. MECANISMO DE TRANSPORTE DE SUBSTRATOS POR TRANSPORTADORES ABC



FONTE: Adaptado (ROBEY ET AL., 2018)

NOTA: **A** - Estrutura química dos ânions fosfato (PO_4^{3-}) e o ortovanadato (VO_4^{3-}). As estruturas evidenciam os estados de protonação em pH neutro. **B** - Representação esquemática da atividade de efluxo de substratos realizada pelos principais transportadores ABC relacionados à MDR.

A literatura reporta inúmeros ensaios de atividade ATPase utilizando membranas de células de inseto e também estudos *in silico* de docking confirmando que o ortovanadato inibe a atividade ATPase. O ortovanadato liga-se no sítio de ligação do fosfato inorgânico com maior afinidade, impedindo a hidrólise de ATP. Contudo, o ortovanadato possui carga negativa, dificultando sua passagem através de membranas biológicas e seu uso em células íntegras (CHUFAN, 2018). Os ensaios de atividade ATPase que utilizam o ortovanadato como inibidor são realizados em sistemas de membranas purificadas (LUGO; SHAROM, 2014). Muito depois da década de 70 foi descoberto que o decavanadato $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$, um polioxometalato também de vanádio, poderia se ligar ao sítio de ligação de fosfato inorgânico dos NBDs, porém a interação com o sítio de ligação de fosfato era energeticamente mais favorável que a do ortovanadato no estudo *in silico* (PEZZA ET AL., 2002).

2.9 SUBSTRATOS TRANSPORTADOS PELA P-GP

A maioria dos substratos da P-gp são moléculas hidrofóbicas que atravessam a membrana plasmática por difusão passiva para entrar nas células. A P-gp interage com uma infinidade de compostos estruturalmente não relacionados, como produtos naturais, esteroides, ionóforos, fluoróforos e quimioterápicos (SHAROM, 2011).

Foram descritos diferentes sítio de ligação de substratos na P-gp, justificando a poliespecificidade observada experimentalmente. Os diferentes sítios são normalmente nomeados como H, R, e P. O sítio H se refere a ligação de Hoechst 33342 e quercetina, o sítio R liga preferencialmente a Rodamina 123, antraciclinas, daunorrubicina e doxorrubicina, e o sítio P faz menção a prazosina e progesterona. O quarto sítio de ligação foi mais recentemente mencionado e acredita-se que ele ligue moduladores não transportados, como o GF120918 (Elacridar) e o nicardipino (MARTINEZ ET AL., 2014).

O trabalho de Subramanian e colaboradores (2019) mostra, através de análises *in silico*, os resíduos de aminoácidos que fazem ligação com Hoechst 33342, rodamina 123, nicardipino e dos inibidores tariquidar e verapamil. Todos compostos se ligam aos sítios de droga, na região transmembrana. Na tabela 1 estão descritos os resíduos de aminoácidos e as hélices transmembrana (TM) envolvidas na ligação dos diferentes substratos.

Tabela 1. Substratos de P-gp e as hélices TM que participam da interação

Substrato	TM	Resíduos de aminoácido relacionados
Hoeschst 3342	TM1	Leu64
	TM6	Phe339, Ser340
	TM9	Gly868, Asn838, Leu839
	TM10	Val869, Met872
	TM11	Val869, Met872
	TM12	Ile977, Val978, Gly980
Rodamina 123	TM1	Leu64, Met67, Met68, Phe71
	TM3	Phe190
	TM6	Ile336, Phe339, Ser340
	TM9	Asn838, Leu839
	TM11	Gln942, Met945, Tyr946, Tyr949
	TM12	Ile977, Val978, Phe979
Tariquidar	TM1	His60
	TM3	Phe189, Ile186, Met188
	TM6	Asn347, Ala352, Asn353, Arg355

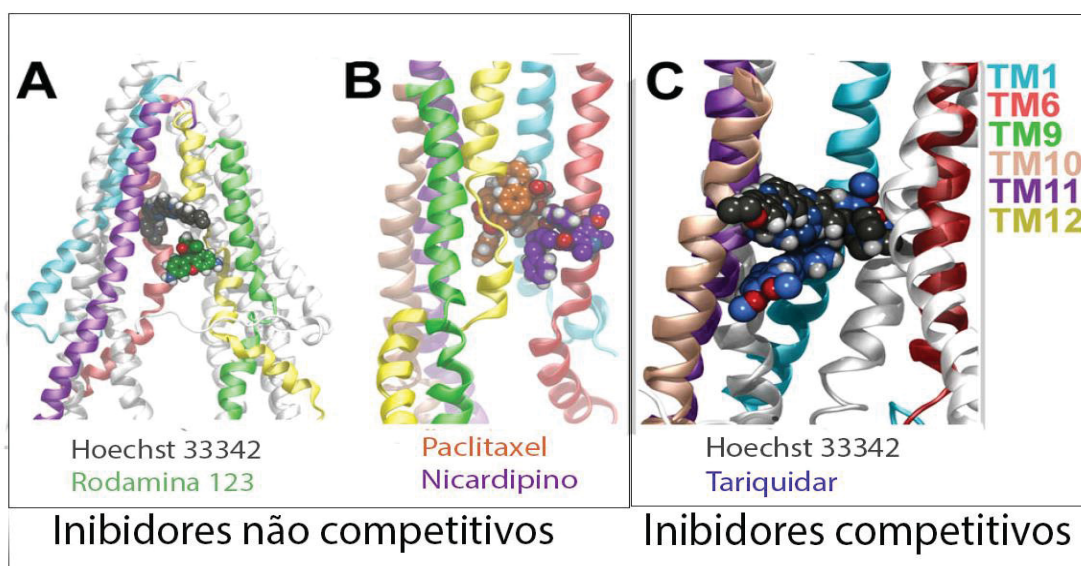
	TM11	Gln834, Asn838
	TM12	Ser988, Asp993, Lys996
Verapamil	TM1	Leu64
	TM5	Leu300, Ile302
	TM6	Phe332, Ile336, Phe339, Ser340
	TM7	Phe724, Ser725, Phe728
	TM8	Leu758
	TM9	Asn838
	TM12	Val978, Phe979, Gly980, Ala981, Met982, Ala983, Val984, Gln986 TM1

FONTE: Adaptado de SUBRAMANIAN et al. 2019.

NOTA: Em negrito estão os resíduos de aminoácido com maior interação em cada TM.

Existem locais onde os substratos se ligam de forma específica, e outros onde se ligam de forma não específica. Assim, alguns substratos podem competir por um mesmo sítio. Quando um desses substratos é inibidor, teremos uma inibição competitiva, e quando não competem pelo mesmo sítio, existe uma inibição não competitiva. Os locais de ligação de alguns substratos e inibidores são apresentados na figura 5.

FIGURA 5. SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE SUBSTRATOS E INIBIDORES NA P-gp



FONTE: Adaptado de SUBRAMANIAN *et al.*, 2019.

NOTA: Os substratos de P-gp (em forma esférica) e os TM (hélices) em sistemas de cores. Na legenda: TM1 (azul), TM6 (vermelho), TM9 (verde), TM10 (rosa), TM11 (roxo) e TM12 (amarelo). **(A)** Hoechst 3342 (cinza) e Rodamina 123 (verde), que são fluoróforos conhecidamente transportados pela P-gp. **(B)** Placlitaxel (laranja), um quimioterápico transportado pela P-gp e Nicardipino (roxo), um inibidor de P-gp. **(C)** Hoechst 3342 (cinza) e Tariquidar (azul), um inibidor de P-gp.

Existem vários substratos já descritos da P-gp, que podem ser específicos ou inespecíficos. Nem todos os substratos da P-gp são

quimioterápicos e estão relacionados com câncer. A tabela 2 apresenta alguns exemplos de substratos não relacionados entre si, e que, no entanto, tem afinidade pela P-gp.

Tabela 2 – Exemplos de substratos da P-gp

Classe	Composto	Referência
Quimioterápicos	Doxorrubicina Daunorrubicina Topotecano Etoposídeo Teniposídeo Paclitaxel Docetaxel Vinblastina Vincristina Colchicina	(ROBEY ET AL., 2018; R. SILVA ET AL., 2015; SZAKÁCS ET AL., 2006; TAMAKI ET AL., 2011)
Inibidores de Tirosina Quinase	Imatinib Gefitinib	(KATHAWALA, GUPTA, ASHBY, CHEN, 2015)
Produtos Naturais	Flavonoides Curcumanoides	(DEWANJEE ET AL., 2017)
Fluoróforos	Rodamina 123 Hoechst 33342 Calceína AM	(FORSTER, THUMSER, HOOD, & PLANT, 2012; KRAPF, GALLUS, NAMASIVAYAM, & WIESE, 2018)
Esteróides	Aldosterona Corticosterona Dexametasona	(R. SILVA ET AL., 2015)
Glicosídeos Cardíacos	Digoxina	(ROBEY ET AL., 2018; R. SILVA ET AL., 2015; TAMAKI ET AL., 2011)

2.10 O USO DE INIBIDORES DA P-gp

O uso de inibidores de transportadores ABC na clínica é um assunto controverso, devido as suas funções fisiológicas. Existem alguns requisitos que são cruciais na busca de novos inibidores: afinidade/especificidade por um único transportador, não ser transportado, baixa toxicidade e não ter interações farmacocinéticas com os quimioterápicos (BOUMENDJEL *et al.*, 2011).

O único transportador ABC em que os inibidores já foram testados na clínica é a P-gp. Para esse transportador, os primeiros compostos testados clinicamente foram chamados de inibidores de primeira geração, a citar:

verapamil, quinidina, quinina, ciclosporina A, amiodarona, nifedipino e dexniguldipina (TAMAKI *et al.*, 2011).

Dentre a segunda geração de inibidores da P-gp destacam-se o biricodar (VX-710), valsopodar (PSC-833), elacridar (GF120918), dexverapamil, derivados da indolizilsulfona e triazinoaminopiperidina. Estes inibidores, embora mais potentes e menos tóxicos do que a primeira geração, apresentaram limitações que os tornaram inviáveis na clínica. Por exemplo, biricodar e valsopodar mostravam interação com o metabolismo do quimioterápico paclitaxel, via citocromo P450, que alterava a biodisponibilidade dos quimioterápicos utilizados na associação aos inibidores (BÁRSONY, SZALÓKI, 2016; CIANFRIGLIA, 2013; HUBER, MARUIAMA, ALMEIDA, 2010; SZAKÁCS *et al.*, 2006). Outros inibidores de segunda geração tiveram performance semelhante, o que fez com que as drogas em questão fossem descontinuadas.

A terceira geração de inibidores da P-gp se destaca por apresentar compostos com alta afinidade e seletividade, como o tariquidar (XR9576), zosuquidar (LY335979), laniquidar (R1011933), CBT-1 e Dofequidar (MS-209). Esses inibidores não apresentaram os problemas das gerações anteriores, sendo potentes em concentrações muito baixas, não tóxicos e não apresentaram interações farmacocinéticas com os quimioterápicos. Contudo, em alguns ensaios clínicos não foi observado diferença entre o grupo tratado com inibidor e o grupo tratado com placebo (PATEL *et al.*, 2017; ROBEY *et al.*, 2018; SAENGGKHAE ET AL, 2014).

A falha clínica do uso de inibidores de terceira geração abriu questionamentos quanto a estratégia e o papel de transportadores ABC na resistência. De um lado estão pesquisadores que acreditam que outros mecanismos de resistência se sobrepõem ao relacionado com a expressão de transportadores ABC. Do outro lado estão os pesquisadores que permanecem acreditando na estratégia do uso de inibidores. Esse segundo grupo de pesquisadores acredita que os testes clínicos apresentaram falhas, pois o nível de expressão do transportador P-gp deveria ter sido monitorado. Também acreditam que é necessário monitorar não apenas a expressão da P-gp, mas outros transportadores ABC, como ABCG2 e MRP1, já que podem ser capazes de transportar os mesmos substratos (TAMAKI *et al.*, 2011).

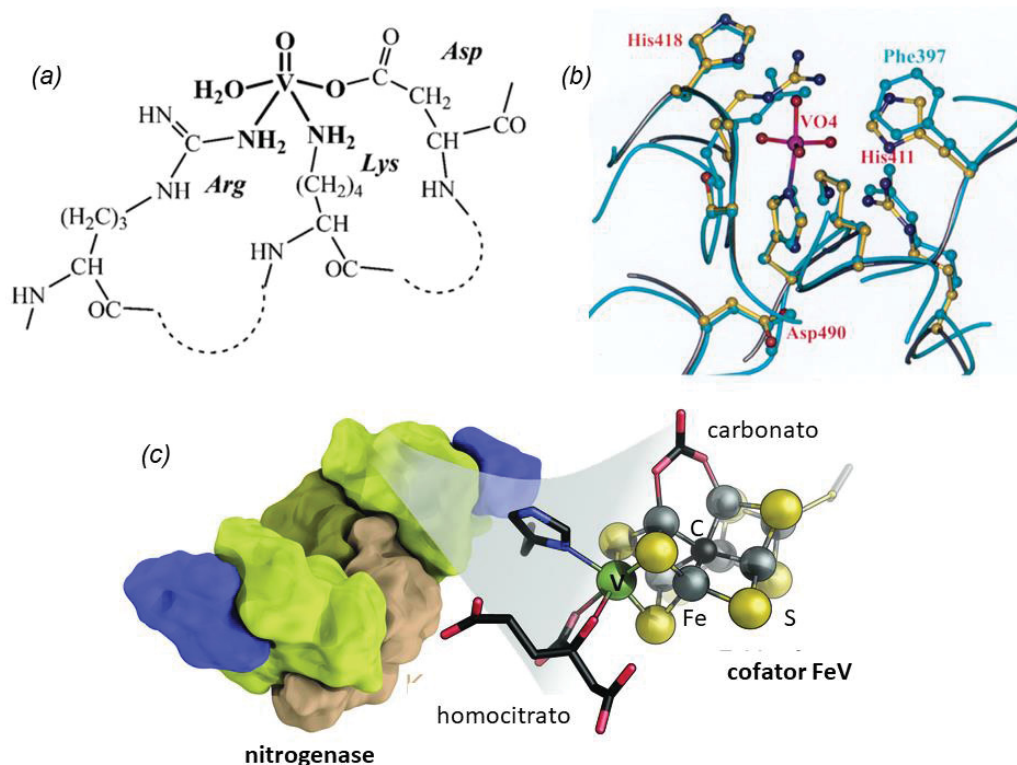
2.11 O VANÁDIO COMO METAL DE INTERESSE BIOLÓGICO E FARMACOLÓGICO

O vanádio é um metal da primeira série de transição amplamente distribuído na crosta terrestre na forma de minerais. A sua abundância natural é comparável à de outros biometais bem estabelecidos como o zinco e o cobre (REHDER, 2018). Em águas oceânicas, ocorre na forma de hidrogenovanadatos que interagem com cátions sódio $\text{Na}[\text{H}_2\text{VO}_4]$ (cerca de $35 \mu\text{M}$) e só perde em abundância para o molibdênio (cerca de $100 \mu\text{M}$). Na água potável, sua concentração é de aproximadamente $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (TSDR, 2012).

O elemento é redox ativo, sendo que os estados de oxidação +IV e +V são mais comumente encontrados em meio aquoso e biológico (PESSOA, 2015). Os compostos biologicamente mais importantes e fisiologicamente mais estáveis são o ânion vanadato e o cátion vanadila $[\text{VO}(\text{OH}_2)_5]^{2+}$, $(\text{VO})^{2+}$.

O vanádio é essencial para alguns líquens e algas marinhas (*Ascophyllum nodosum* e *Corallina pilulifera*) e tem sido produzido como parte (centro metálico) da amavadina (FIGURA 6a), pelo fungo *Amanita muscaria* (DA SILVA, 2013). Esse metabólito ainda não possui atividade biológica conhecida, porém devido à presença do centro de vanádio(IV) e de sua fácil interconversão entre os estados de oxidação +IV e +V, acredita-se que exista uma função de transferência de elétrons, atuando na proteção contra o estresse oxidativo no fungo (OOMS *et al.*, 2014).

FIGURA 6. REPRESENTAÇÕES DE INTERAÇÃO DO VANÁDIO



FONTE: (REES et al., 2015; REHDER, 2013)

NOTA: (a) Ambiente de coordenação do vanádio(IV) na amavadina, segundo proposta gerada a partir de dados de Ressonância Paramagnética eletrônica (RPE) (b) Estrutura secundária da região do sítio ativo de duas bromoperoxidases (VBPO (colorido) e VCPO (azul)) evidenciando a região conservada. (c) representação da enzima nitrogenase alternativa de vanádio evidenciando o cofator FeV.

O elemento pode ser encontrado no sítio ativo de duas enzimas dependentes de vanádio: (a) as haloperoxidases, onde catalisa reações de bromação e iodinação de substratos orgânicos (FIGURA 6b); e (b) na nitrogenase alternativa de vanádio (V-N₂ase), presente em bactérias do solo fixadoras de nitrogênio do tipo *Azotobacter vinelandii*. Esta enzima possui um cofator complexo de fórmula $[V:7Fe:8S:C]$, (FIGURA 6c) (SIPPEL; EINSLE, 2018) que catalisa a conversão da molécula de N₂, bastante inerte, ao cátion NH₄⁺ (HU, LEE, RIBBE, LEE, 2012).

Em organismos superiores a essencialidade do vanádio ainda não foi comprovada, embora já se conheça que o elemento pode ser tolerado em doses moderadas (7,8 a 10 mg de vanádio por dia/2 semanas em pacientes diabéticos) (MOHAMMAD, FOROUGH, 2008). Nos anos 70 foi descoberto que os compostos de vanádio poderiam ser potentes inibidores da Na⁺/K⁺ ATPase. Assim, nas décadas seguintes o interesse medicinal dos compostos de vanádio

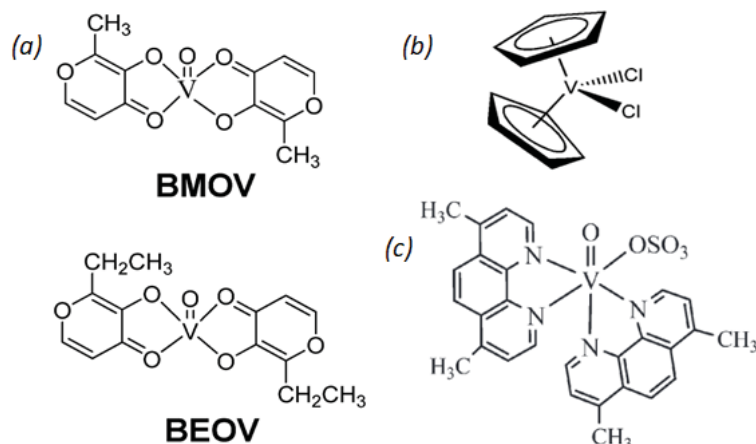
aumentou, devido a grande variedade de alvos biológicos possíveis para este elemento (PEZZA *et al.*, 2002).

Atualmente, um grande número de compostos de vanádio tem sido sintetizado e caracterizado como agentes terapêuticos em potencial para o tratamento do diabetes mellitus, do câncer, de doenças causadas por parasitas, vírus, bactérias e têm sido avaliados como agente anti-trombótico, anti-hipertensivo, anti-aterosclerótico e espermicida (TREVÍÑO *et al.*, 2019).

Dentre eles destacam-se os que atuam como insulinoimímicos, como o *bis*(maltolato)oxovanádio(IV), o *bis*(etil maltolato)oxovanádio(IV) (FIGURA 7a) (PETERS *et al.*, 2003). Estes compostos estimulam o catabolismo de glicose nas células e a lipogênese (síntese de ácidos graxos e triglicerídeos), reduzindo os níveis de glicose no sangue. Seu tratamento tem foco na deficiência de insulina (diabetes tipo 2), que atinge com mais frequência pessoas idosas e jovens obesos (PETERS *et al.*, 2003).

Com relação a ação antitumoral os compostos de maior destaque são os vanadocenos (FIGURA 7b), peroxovanadatos, oxovanadatos(IV), como o Metvan (FIGURA 7c), vanádio-peróxido-betaínas e polioxovanadatos. Estes compostos têm apresentado atividade de redução de tumores *in vivo* e *in vitro*, destacando-se a inibição da proliferação celular e indução de apoptose. Por exemplo, o Metvan apresenta atividade citotóxica e indutora de apoptose em 25 linhagens de células de câncer humano, incluindo leucemia, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiplo, tumores sólidos derivados de câncer de mama, ovário, próstata e testículos (SANNA *et al.*, 2017). Recentemente foram incluídos nesta lista linhagens celulares humanas de osteosarcoma (MG-63) e adenocarcinoma de colón (LEÓN, 2018).

FIGURA 7. ESTRUTURAS DE COMPOSTOS DE VANADIO COM ATIVIDADE BIOLÓGICA



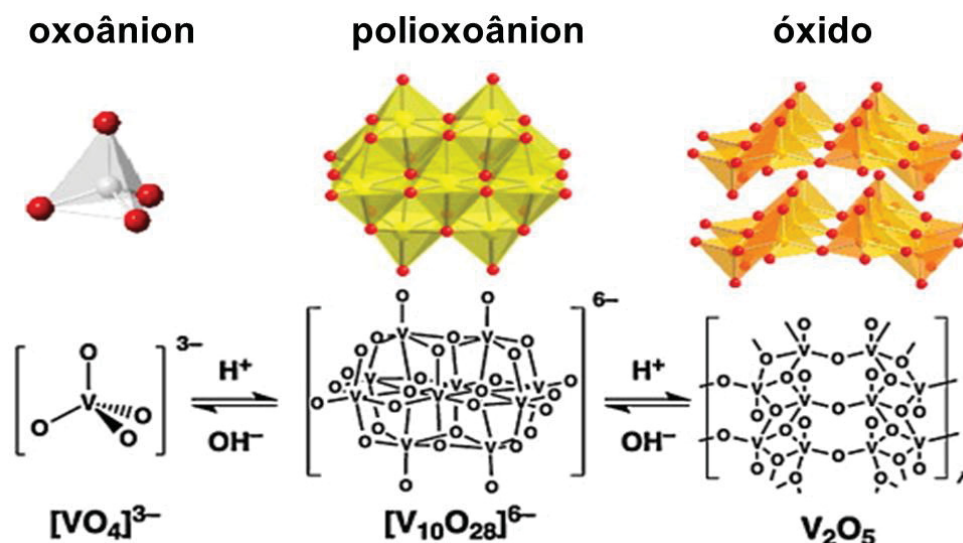
FONTE: (WINTER, P. W. et al. 2012; PESSOA, J. C., 2015. GHOSH, P. et al., 2000).

NOTA: (a) Estrutura dos complexos *bis*(maltolato)oxovanádio(IV) que atuam como insulinomimético; (b) Estrutura do *bis*(ciclopentadienil)dicloro-V(IV); (c) Estrutura do *bis*(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)sulfatoxovanádio(IV) (Metvan) anticancerígeno multi-segmentar promissor com atividade indutora de apoptose

2.12 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO ÂNION DECAVANADATO E OUTROS POLIOXOMETALATOS

Os polioxometalatos (POMs) são agregados oligoméricos de cátions de metais de transição, em especial V (vanádio), Nb (nióbio), W (tungstênio) e Mo (molibdênio), em estados de oxidação altos, unidos por grupos oxido (O^{2-}) em ponte (Cogdell, 2013). Os polioxovanadatos (POVs) são menos estudados que os demais polioxometalatos e só passaram a receber destaque nas últimas duas décadas. Eles são geralmente formados em solução aquosa quando um oxidoânion é protonado em decorrência de variações de pH, temperatura ou concentração do meio (FIGURA 8) (MONAKHOV, 2015).

FIGURA 8. ESPÉCIES MAIS COMUNS DE DISSOCIAÇÃO DE OXOVANÁDIO EM MEIO AQUOSO

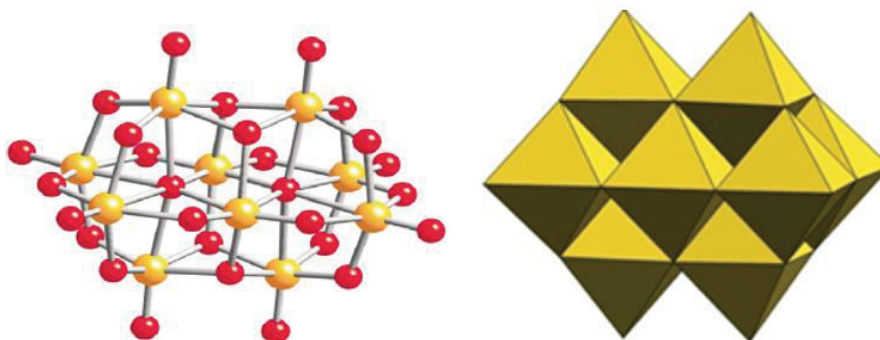


FONTE: (AURELIANO; CRANS, 2009)

NOTA: Esquema ilustrativo das reações sofridas por espécies de oxovanádio(V) em meio aquoso apresentando as duas formas mais comuns de representação dos oxocompostos de vanádio.

Dentre os polioxovanadatos, o ânion decavanadato $[H_xV_{10}O_{28}]^{6-x}$, V_{10} (FIGURA 9) tem sido o mais explorado em suas propriedades biológicas, como interação com proteínas e aplicações farmacológicas (AURELIANO, 2016). Entre as atividades já descritas estão a ação antidiabética (THOMPSON *et al.*, 2009), antitumoral (EVANGELOU, 2002), antiviral (MAURYA *et al.*, 2006) e antimicrobiana (MISSINA *et al.*, 2018).

FIGURA 9. FORMAS REPRESENTATIVAS DO ÂNION DECAVANADATO



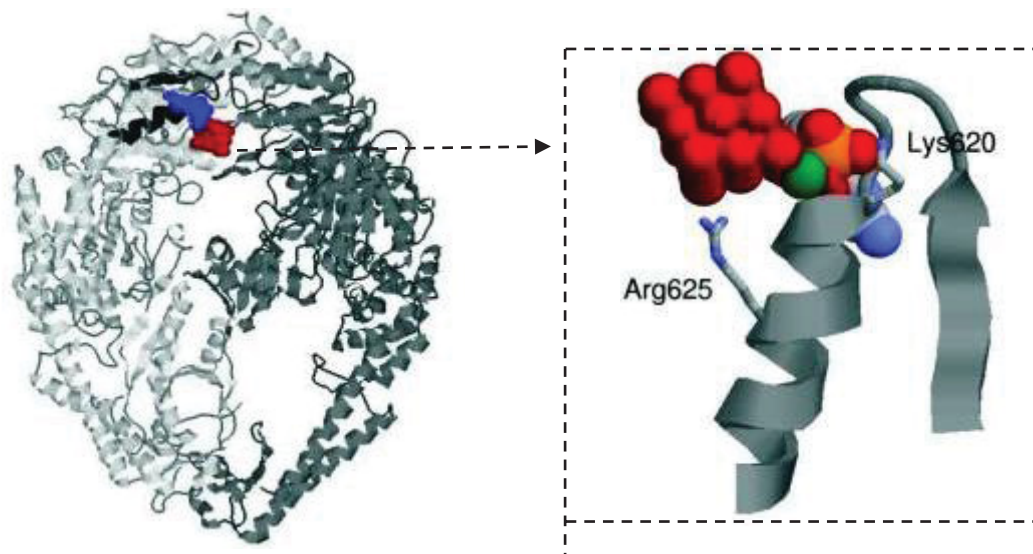
FONTE: Adaptado de (WINTER, P. W. *et al.* 2012; PESSOA, J. C., 2015. GHOSH, P. *et al.*, 2000).

NOTA: Estrutura de bolas e bastões do ânion decavanadato, $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ (esquerda). As bolas amarelas representam os centros de vanádio(V) e as bolas vermelhas os oxigênios. A direita, é representada a estrutura de poliedros.

A associação de compostos orgânicos e inorgânicos tem algumas ações documentadas em áreas como a ciência de materiais e biomateriais. Os polioxovanadatos parecem ter ação sinérgica com cátions orgânicos, que potencializam sua ação biológica (EL MOLL *et al.*, 2011).

Com relação às propriedades biológicas, especula-se se os decavanadatos (V_{10}) tem como alvos enzimas dependentes de fosfato, como as ATPases e fosforilases (PEZZA ET AL., 2002), além de proteínas de membrana celular (AURELIANO, OHLIN, 2014). Além de afetar uma gama de processos bioquímicos, recentemente foi relatado que o decavanadato também pode atuar como agente potencializador de insulina. Um exemplo é a $(H_2metf)_3[V_{10}O_{28}] \cdot 8H_2O$, onde H_2met = cátion metformínio, que foi considerado não só como insulinomimético, mas também como capaz de diminuir o nível de colesterol no sangue (SÁNCHEZ-LARA ET AL., 2018). O $(H_2metf)_3[V_{10}O_{28}] \cdot 8H_2O$ e outros derivados do V_{10} , como o $(H_2tmen)_3V_{10}O_{28} \cdot 6H_2O$ e o $(H_2en)_3V_{10}O_{28} \cdot 2H_2O$ (onde em = etilenodiamina) apresentam atividade anticâncer *in vitro* contra linhagens de células tumorais A549 e P338. O composto $Na_4Co(H_2O)_6V_{10}O_{28} \cdot 18H_2O$ mostrou-se ativo na supressão do crescimento em tumores de fígado de camundongo *in vivo* (ZHAI *et al.*, 2009).

As habilidades de V_{10} de interagir de forma intacta com diversas enzimas e proteínas têm sido evidenciadas por diversas técnicas, incluindo difratometria de raios X de monocristal e docking (FIGURA 10) (RAMOS, AURELIANO, 2013). Assim, a interação de V_{10} com enzimas dependentes de fosfato tornou-se muito interessante para o meio científico, pois o potencial medicinal do V_{10} poderia ser explorado. Porém, uma vez presente no meio extracelular, não se sabe se o decavanadato, um ânion volumoso e de alta densidade de carga seria capaz de atravessar membranas biológicas (TURNER ET AL., 2012; ZHAI ET AL., 2009). Nesse sentido, estudos envolvendo o V_{10} e outros polioxovanadatos mais complexos, vêm sendo avaliados para que se conheça o comportamento em meios intra e extracelulares (GALANI ET AL., 2015).

FIGURA 10. A INTERAÇÃO DO DECAVANADATO COM A MutS DE *E. coli*

FONTE: Adaptado de (PEZZA, 2002).

NOTA: Interação do decavanadato (V_{10}) com a proteína MutS obtido por docking. A imagem aumentada mostra o sítio de ligação de ATP em que o decavanadato se ligaria.

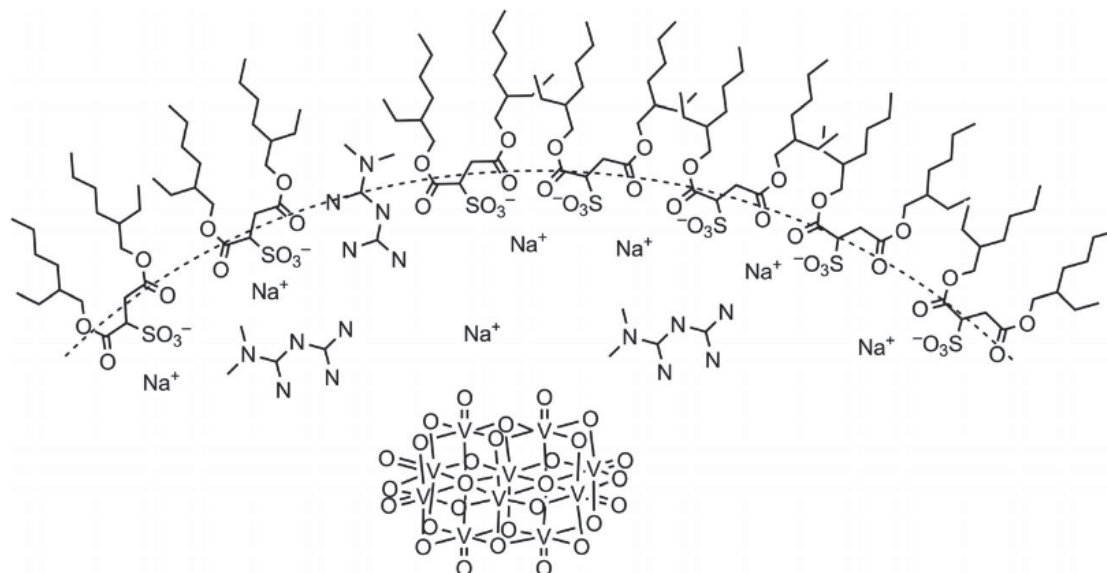
A carnitina tem ação preventiva contra a carcinogênese em inúmeras linhagens celulares tumorais de murinos e humanos. A associação de V_{10} com a carnitina elevou o potencial anti-carcinogênico em cerca de 10 vezes com relação ao ortovanadato e aos decavanadatos associados a cátions simples como o tetrametiletilenodiamônio e etilenodiamônio (GALANI ET AL., 2015).

De forma análoga e utilizando cátions orgânicos associados, o trabalho de Wang e colaboradores (2017) selecionou a nicotinamida para ensaios com células que superexpressavam a P-gp. Esse cátion é derivado da vitamina B3, ou niacina - vitamina hidrossolúvel cujos 4 derivados (NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$ e $NADPH$) desempenham importante papel no metabolismo energético celular e na reparação do DNA (WANG et al., 2017). O sal de nicotinamida apresentou atividade inibitória *in vitro* para P-gp, mostrando-se pouco tóxica e revertendo a resistência frente a quimioterápicos como paclitaxel e daunorrubicina (QIU ET AL., 2017).

Estudos mostram que apesar do decavanadato se dissociar de seus cátions em solução, a presença das moléculas orgânicas altera a organização dos íons e moléculas de água próxima à interface (FIGURA 11) (CHATKON et al. 2013), modificando seu modo de interação com a membrana e

principalmente com as proteínas de membrana que tem seu modo de atuação regulado por interações alostéricas.

FIGURA 11. MODELO DE INTERAÇÃO DO ANION ((HMET)₂V₁₀) COM A MEMBRANA

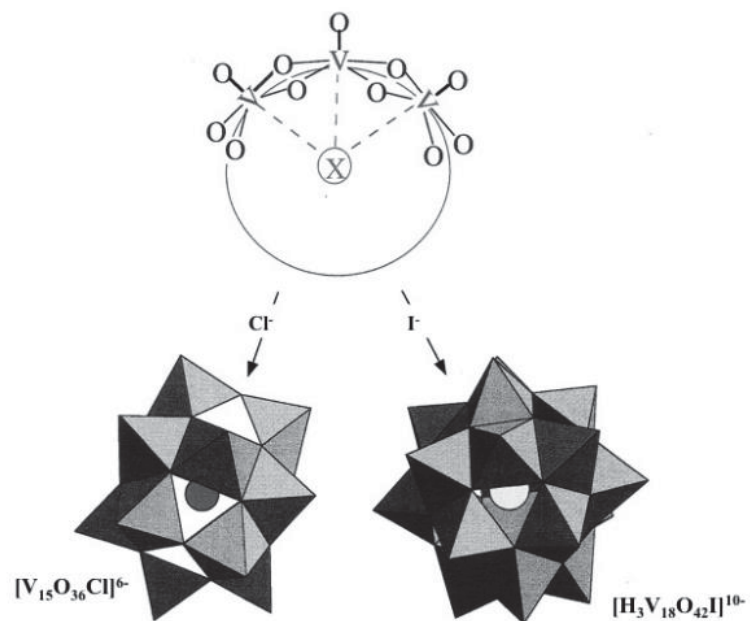


FONTE: (CHATKON, 2013).

NOTA: Esquema proposto para a interação de ((Hmet)₂V₁₀) com a micela reversa a partir de dados de RMN e IV.

Os polioxovanadatos de valência mista (IV+/V+) não são tão explorados quanto o decavanadato para seu potencial medicinal, mesmo que em condições fisiológicas estes estados de oxidação sejam predominantes (BISHAYEE, WAGHRAY, PATEL, & CHATTERJEE, 2010; MONAKHOV ET AL., 2015). Os polioxovanadatos de valência mista contêm um íon ou molécula encapsulada no centro do poliedro. Estes compostos podem adotar estruturas de clusters circulares, na forma de tigela ou esféricas. Neste trabalho escolhemos o tipo mais comum, os POVs pseudoesféricos com um ânion encapsulado (FIGURA 12), pois estudos recentes demonstram que estes possuem um grande potencial para atuar como agentes anticancerígenos (QI ET AL., 2017).

FIGURA 12. EXEMPLOS DE POLIOXOVANADATOS CONTENDO ÂNIOS ENCAPSULADOS



FONTE: (LIVAGE, 2010)

NOTA: Exemplos de polioxovanadatos contendo ânions encapsulados.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar e caracterizar o efeito de polioxovanadatos sobre a atividade dos transportadores ABC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a capacidade dos polioxovanadatos em inibir o transporte de substratos mediado pelos transportadores P-gp, ABCG2 e MRP1;
- Determinar os valores de IC₅₀ de inibição;
- Avaliar a citotoxicidade e o transporte dos polioxovanadatos;
- Avaliar o mecanismo de inibição;
- Avaliar se os polioxovanadatos são capazes de penetrar a membrana plasmática das células.

4. JUSTIFICATIVA

O estudo de novos inibidores é um dos principais recursos para reverter o fenótipo de resistência mediado por transportadores ABC superexpressos em diversos tipos de câncer. Assim, torna-se extremamente importante identificar e caracterizar o efeito de novos inibidores de transportadores ABC. Além disso, a estratégia de identificar inibidores de transportadores ABC que se ligam nos NBDs (região conservada) é promissora, pois um único inibidor poderia reverter à resistência mediada por diferentes transportadores ABC.

Oxidocompostos de vanádio, e em especial o ânion decavanadato, $[H_xV_{10}O_{28}]^{6-x}$, são capazes de interagir com diferentes proteínas no meio biológico, alterando suas funções. Desta forma, neste trabalho buscou-se avaliar o efeito do ânion decavanadato frente à atividade dos transportadores ABC.

Os compostos estudados foram selecionados de forma a abranger três variações do ânion decavanadato, o qual é o polioxovanadato mais estudado, e três polioxovanadatos de valência mista (TABELA 3).

TABELA 3. Polioxovanadatos avaliados e suas características químicas

Composto / Código	Característica	Ref.
$[Na_6(H_2O)_{20}V_{10}O_{28} \cdot 4H_2O]_n$ NaV₁₀	10 V ^V e cátion sódio	(RAMOS ET AL., 2013)
$(nico)_4[H_2V_{10}O_{28}] \cdot 2H_2O \cdot 2(nico)$ NicoV₁₀	10 V ^V e o cátion nicotinamídio	(MISSINA ET AL., 2018)
$(iso)_4[H_2V_{10}O_{28}] \cdot 2(iso)$ IsoV₁₀	10 V ^V e o cátion isonicotinamídio	(MISSINA ET AL., 2018)
$K(NH_4)_4[H_6V_{14}O_{36}(PO_4)] \cdot 11H_2O$ V₁₄P	2 V ^{IV} , 12 V ^V e um ânion PO ₄ ³⁻ encapsulado.	(POSTAL ET AL., 2016)
$(Me_4N)_6[V_{15}O_{36}Cl]$ V₁₅Cl	7 V ^{IV} , 8 V ^V e um ânion Cl ⁻ encapsulado.	(POSTAL ET AL., 2016)
$(NH_4)_2(Me_4N)_6[V_{18}O_{42}I] \cdot 5H_2O$ V₁₈P	12 V ^{IV} , 6 V ^V e um ânion I ⁻ encapsulado.	(POSTAL ET AL., 2016)
$(RhoBH)_4[H_2V_{10}O_{28}](RhoB)_2 \cdot 13H_2O$ RhoBV₁₀	10 V ^V e cátion RhoBH	^a

^a Dados não publicados

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 POLIOXOVANADATOS UTILIZADOS

Os polioxovanadatos testados $[\{\text{Na}_6(\text{H}_2\text{O})_{20}\text{V}_{10}\text{O}_{28}\cdot 4\text{H}_2\text{O}\}_n]$ (**NaV₁₀**), $(\text{nico})_4[\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}\cdot 2(\text{nico})$, (**NicoV₁₀**), $(\text{iso})_4[\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 2(\text{iso})$ (**IsoV₁₀**), $(\text{RhoBH})_4[\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}](\text{RHOB})_2\cdot 13\text{H}_2\text{O}$, (**RhoBV₁₀**), $\text{K}(\text{NH}_4)_4[\text{H}_6\text{V}_{14}\text{O}_{36}(\text{PO}_4)]\cdot 11\text{H}_2\text{O}$ (**V₁₄**), $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}\text{Cl}]$ (**V₁₅**), $(\text{NH}_4)_2(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{18}\text{O}_{42}\text{I}]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**V₁₈**) foram sintetizados e fornecidos pelo grupo de síntese inorgânica da UFPR, coordenados pelas professoras Dra. Giovana Gioppo Nunes e Dra. Jaisa Fernandes.

5.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Os polioxovanadatos foram armazenados na forma sólida em ambiente seco e ao abrigo da luz. Eles foram pesados e preparados na concentração de 10 mM em solução aquosa imediatamente antes do uso. A partir dessa solução estoque foram realizadas as demais diluições em meio de cultura para se obter as concentrações desejadas em cada experimento (1,0 – 250 μM).

5.3 LINHAGENS CELULARES

Foram utilizadas células controle (*wild type*), que não expressam os transportadores de interesse e células transfectadas de maneira estável para superexpressar cada transportador ABC (TABELA 4). Para estudos envolvendo o transportador P-gp foram utilizadas células NIH3T3 transfectadas com o gene que codifica para ABCB1 (NIH3T3-*ABCB1*). Para o transportador ABCG2 foram utilizadas células HEK293 transfectadas com o gene que codifica para ABCG2 (HEK293-*ABCG2*). Para o transportador MRP1 foram utilizadas células BHK21 transfectadas com o gene que codifica para ABCC1 (BHK21-*ABCC1*). Todas as linhagens celulares, transfectadas e não transfectadas, foram provenientes do *Institut de Biologie et de Chimie des Protéines*, cedidas gentilmente pelo Dr. Attilio Di Pietro.

TABELA 4. Linhagens celulares utilizadas

Tipo celular	Linhagens parentais	Linhagens transfectadas (linhagem- <i>GENE</i>)	Agente de Seleção	Inibidor de referência utilizado	Substratos utilizados
Fibroblasto (camundongo)	NIH3T3 (<i>wild type</i>)	NIH3T3- <i>ABCB1</i>	Colchicina (60 ng/mL)	Elacridar (GF120918) (1,0 μ M)	Rodamina 123 (5 μ M)
Fibroblasto (hamster)	BHK21 (<i>wild type</i>)	BHK21- <i>ABCC1</i>	Metotrexato (0,1 mg/mL)	Verapamil (30 μ M)	Calceína (0,01 μ M)
Fibroblasto (humano)	HEK293 (<i>wild type</i>)	HEK293- <i>ABCG2</i>	G418 (0,75 mg/mL)	Elacridar (GF120918) (1,0 μ M)	Mitoxantrona (5 μ M)

Fonte: Adaptado (CARDARELLI ET AL., 1995; X. B. CHANG, HOU, & RIORDAN, 1997; ROBEY ET AL., 2003).

5.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio utilizado foi o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose* (DMEM alta glicose), com pH entre 7,2 e 7,4. O meio foi suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C em 5% de CO₂. A linhagem NIH3T3-*ABCB1* foi adicionalmente cultivada na presença de anfotericina.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DOS TRANSPORTADORES ABC (ABCG2, P-GP E MRP1)

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços (1,5x10⁴ células por poço). Após 24 h de adesão as células foram tratadas com Rodamina 123 (5 μ M) ou Mitoxantrona (5 μ M) ou Calceína-AM (0,01 μ M) por 30 min a 37 °C na presença ou ausência de diferentes concentrações dos compostos (polioxovanadatos) testados, ou ainda com inibidores de referência. Após a incubação por 30 min com substratos e inibidores, as células foram lavadas com solução salina (PBS), tripsinizadas, ressuspensas em 0,2 mL de PBS

gelado e mantidas em gelo até o momento da análise, a qual foi realizada por citometria de fluxo. Foram coletados no mínimo 10.000 eventos de cada amostra, sendo que o controle de 100% de inibição foi obtido pela fluorescência (mediana de fluorescência) das células controle (*wild-type*), ou usando células transfectadas incubadas com inibidores de referência (GF 120918 a 0,5 μM para P-gp, Ko143 a 0,5 μM para ABCG2 e Verapamil a 30 μM para MRP1) (Robey et al., 2001). Todos os experimentos são feitos em, no mínimo, triplicatas independentes. Os resultados foram expressos como percentuais de inibição em relação ao inibidor de referência. Os valores de IC_{50} foram calculados utilizando o programa GraphPadPrism.

5.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO E EFEITO SOBRE TRANSPORTE MEDIADO PELO TRANSPORTADOR P-gp ATRAVÉS DE ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Foi utilizado o método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) para avaliar a viabilidade celular (HEO et al., 1990). Células NIH3T3-*ABCB1* e NIH3T3 *wild type* foram plaqueadas em placas de 96 poços ($2,0 \times 10^4$ células por poço). Após 24 h de adesão as células foram tratadas com concentrações crescentes dos compostos (0,78– 25 μM) por 24 h para obtenção dos dados de citotoxicidade. O período de incubação ocorreu em estufa sob as condições de 37 °C e 5% CO_2 . O controle de 100% de células viáveis foi realizado com meio de cultura sem o composto a ser analisado no experimento. Após o período de incubação, o tratamento foi removido, o poço foi lavado com PBS e 100 μL de solução de MTT em PBS (0,5 mg mL^{-1} – concentração final) foram adicionados. Foi feito outro período de incubação de 4 h, sob as mesmas condições já mencionadas, possibilitando o processo de redução do MTT a cristais de formazan. Após a incubação, os cristais de formazan foram dissolvidos utilizando uma solução de DMSO e etanol (1:1). A absorbância foi determinada utilizando um leitor de microplaca Multiscan FC (Thermo Scientific) sob o comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (sem tratamento).

5.7 ENSAIOS DE LONGA DURAÇÃO

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após 24 h de adesão as células que superexpressam P-gp e as células *wild type* foram expostas ao inibidor de interesse (**NaV₁₀** ou **V₁₈**) em diferentes tempos de incubação em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. As concentrações utilizadas foram de 1,0 µM, 10 µM e 50 µM de inibidor diluído em meio DMEM alta glicose para cada condição. Após a exposição ao inibidor, as células passaram por mais uma incubação de 30 minutos com Rodamina 123, sem que o inibidor fosse removido. Os tempos de exposição aos inibidores utilizados totalizaram 30 min, 1 h e 3 h, em experimentos independentes.

Em uma segunda bateria de ensaios, foram utilizadas as mesmas condições de concentração e tempo, porém, antes da incubação com o substrato rodamina 123, ocorreram duas etapas de lavagem com PBS. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, coletadas por tripsinização, ressuspensas em 0,2 mL de PBS gelado e mantidas em gelo até o momento da análise, a qual foi realizada por citometria de fluxo.

5.8 MICROSCOPIA CONFOCAL

Células NIH3T3-*ABCB1* foram plaqueadas ($1,0 \times 10^5$ células por poço) em placas de 24 poços contendo lamínulas para microscopia e incubadas sob condições de 37 °C e 5% CO₂ por 48 h para que uma confluência celular de 80-90% fosse atingida. Após o período de incubação o meio de cultura foi retirado e as células aderidas à lamínula foram tratadas com o **NaV₁₀** ou **V₁₈** na concentração de 50 µM (saturante) na presença de Rodamina 123 (5,0 µM) por 30 min sob as mesmas condições de incubação já mencionadas. Após o período de tratamento, as lamínulas foram retiradas dos poços e dispostas em lâminas para microscopia, as quais foram lidas por microscopia confocal sob aumento de 40 vezes.

5.9 LIGAÇÃO ANTICORPO CONFORMACIONAL 17F9

A análise do anticorpo conformacional foi feita com a linhagem NIH3T3-*ABCB1*. Foram utilizadas $5,0 \times 10^5$ células para cada condição. As amostras foram centrifugadas a $1.000 \times g$ por 3 min e o sobrenadante foi descartado. Os pellets celulares foram ressuspensos com 100 μL de PBS e 4,0 μL de solução de albumina de soro bovino (BSA) 1,0 mg/mL foram adicionados a cada amostra. Após essa etapa, as alíquotas de células foram incubadas com os compostos Rodamina 123 (5,0 μM), GF120918 (1,0 μM), **NaV**₁₀ (50 μM) e **V**₁₈ (50 μM) por 10 min em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após esse período foi adicionado o anticorpo primário anti-P-gp clone 17F9 (1:100) e as amostras foram incubadas por mais 30 min em estufa de CO₂ a 37 °C. Novamente, as amostras foram centrifugadas a $1.000 \times g$ por 3 min e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 100 μL de PBS para ressuspender os pellets e o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com o fluoróforo PE (ficoeritrina) (1:200). As amostras foram novamente incubadas por 30 minutos a 37 °C em estufa de CO₂ e depois centrifugadas a $1.000 \times g$ por 3 min. O sobrenadante foi descartado e os pellets ressuspensos em 300 μL de PBS. A leitura foi realizada em Citômetro FACS Calibur canal FL2-H.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

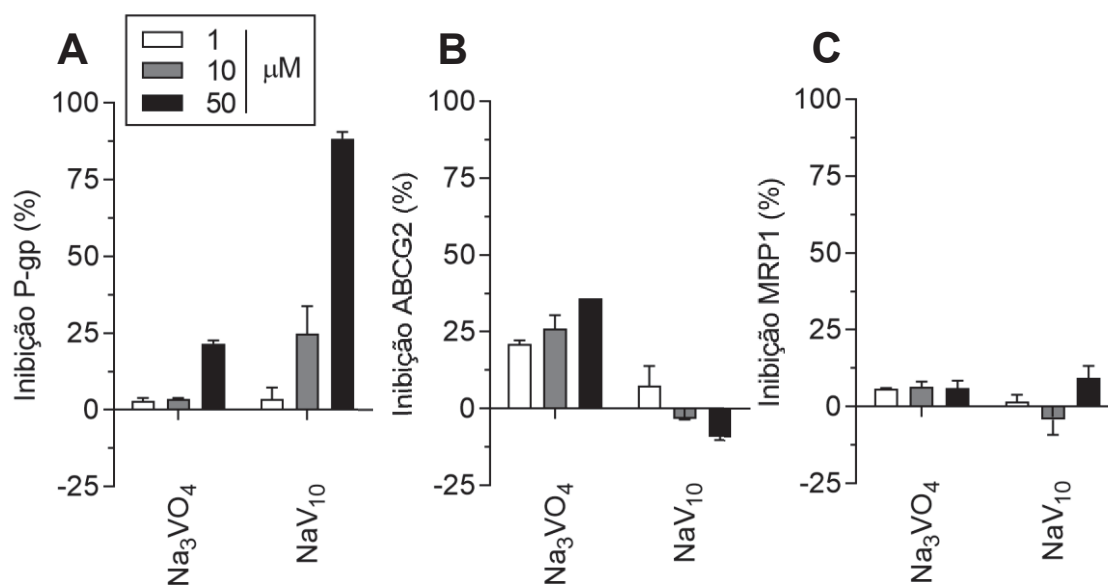
6.1 INIBIÇÃO DOS TRANSPORTADORES ABC PELO ORTOVANADATO VERSUS DECAVANADATO (Na_3VO_4 x NaV_{10})

Sabendo que o ortovanadato (Na_3VO_4) é utilizado como um inibidor da atividade ATPase de transportadores ABC, por ocupar o sítio de ligação do fosfato inorgânico (Pi) com maior afinidade (JIANG et al., 2018), foi avaliado inicialmente o efeito de diferentes vanadatos sobre os três principais transportadores ABC responsáveis pela resistência à quimioterapia, P-gp, ABCG2 e MRP1.

Para avaliar se os decavanadatos atuam como inibidores dos transportadores ABC foram utilizadas células transfectadas de maneira estável para superexpressar cada um dos três transportadores ABC, P-gp, ABCG2 e MRP1. A inibição foi avaliada por citometria de fluxo utilizando substratos específicos desses transportadores, em comparativo com células controle.

Inicialmente os decavanadatos e o composto controle (ortovanadato de sódio, Na_3VO_4 , V_1) foram testados nas concentrações de 1, 10 e 50 μM frente à atividade de transporte da P-gp, MRP1 e ABCG2 (FIGURA 13). O ortovanadato (V_1) mostrou uma discreta inibição da P-gp (~20%) na maior concentração testada (50 μM) (FIGURA 13). No caso do transportador ABCG2, a inibição foi muito discreta, variando de 20 a 35% nas concentrações testadas. A inibição produzida pelo ortovanadato foi desprezível estatisticamente para MRP1 (5%) em todas as concentrações testadas (FIGURA 13). O decavanadato (NaV_{10}) não apresentou efeito de inibição para a MRP1 e para a ABCG2. No entanto, o NaV_{10} apresentou uma inibição da P-gp dependente da concentração. A inibição produzida na concentração de 50 μM aumentou drasticamente em relação à observada para o ortovanadato, passando de 20% para 80%.

FIGURA 13. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DE ORTOVANADATO (Na_3VO_4) E DO DECAVANADATO DE SÓDIO (NaV_{10}) SOBRE OS TRANSPORTADORES ABC



FONTE: O Autor (2019)

NOTA: Avaliação da capacidade de inibição de ortovanadato (V_1) e decavanadato de sódio (NaV_{10}) sobre os transportadores ABC. A capacidade de inibir o transporte de substratos mediados por transportadores ABC foi realizada por citometria de fluxo. (A) Células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp) foram expostas concomitantemente ao substrato Rodamina 123 (5,0 μM) e aos compostos (1,0 μM, 10 μM e 50 μM) por 30 min. A porcentagem de inibição foi determinada usando o inibidor de referência GF120918 (1,0 μM), que produz uma inibição de 100%. (B) Células HEK293-*ABCG2* foram expostas concomitantemente ao substrato Mitoxantrona (5 μM) e aos compostos (1, 10 e 50 μM) por 30 min. A porcentagem de inibição foi determinada usando o inibidor de referência Ko143 (1,0 μM), que produz uma inibição de 100%. (C) Células BHK21-*ABCC1* (MRP1) foram expostas concomitantemente ao substrato calceína-AM (0,01 μM) e aos compostos (1,0 μM, 10 μM e 50 μM) por 30 min. A porcentagem de inibição foi determinada usando o inibidor de referência Verapamil (30 μM), que produz uma inibição de 100%. Controles adicionais de inibição foram realizados com células não transfectadas (*wild type*). Os resultados representam a média ± SD de três experimentos independentes.

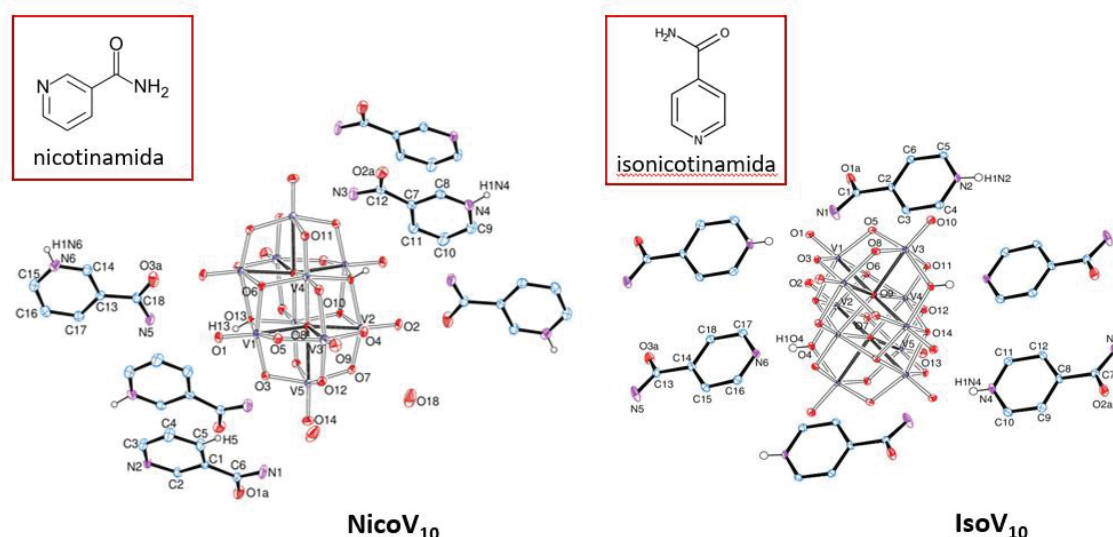
Um efeito relativo a nuclearidade e tamanho dos oxometalatos (V_1 versus V_{10}) já havia sido descrito em outra família de ATPases. Ambos oxometalatos foram capazes de inibir a atividade ATPase da MuTS de *E. coli*, proteínas da superfamília ABC, envolvidas no sistema de reparo de DNA (PEZZA *et al.*, 2002). Ensaios de *docking* com a região do sítio da ligação de $\text{MUT} \pm \text{ADP} \pm \text{Mg}$ mostraram que a interação do V_{10} é energeticamente mais favorável do que a do VO_4^{3-} , sugerindo que naquele caso, o aumento do potencial inibitório foi devido a um efeito estérico que impede a troca ATP/ADP pela proteína (PEZZA *et al.*, 2002).

6.2 INIBIÇÃO DA P-gp PELOS DECAVANADATOS: EFEITO DA PRESENÇA DE CÁTIONS ORGÂNICOS

Na última década o interesse na atividade biológica do ânion decavanadato aumentou muito, não apenas com foco no papel que o polioxoânion desempenha, mas também na modulação de suas propriedades, quando este é associado a cátions orgânicos (MISSINA *et al.*, 2018). Também, de alguma forma a associação poderia facilitar a entrada do composto na célula. Desta forma, utilizando o racional de unir o **V₁₀** a compostos orgânicos atóxicos, que possam estar presentes em meio biológico, escolhemos a 3-piridinacarboxiamida (nicotinamida) e seu isômero, a 4-piridinacarboxiamida (isonicotinamida), como componentes orgânicos.

Neste trabalho foram avaliados o $\{Na_6(H_2O)_{20}V_{10}O_{28} \cdot 4H_2O\}_n$, **NaV₁₀**, contendo apenas contraíons inorgânicos e os decavanadatos contendo os cátions nicotinamídio $((nicoH)_4[H_2V_{10}O_{28}] \cdot 2H_2O \cdot 2nico)$, **NicoV₁₀**, e isonicotinamídio $((isoH)_4[H_2V_{10}O_{28}] \cdot 2iso)$, **IsoV₁₀** (FIGURA 14).

FIGURA 14. DIAGRAMA ORTEP DE **NicoV₁₀** E **IsoV₁₀**



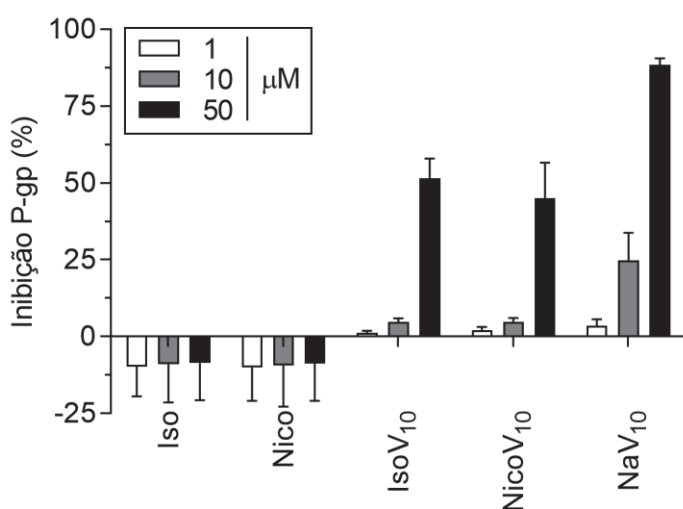
FONTE: (MISSINA *et al.*, 2018)

NOTA: Diagrama ORTEP de $(nicoH)_4[H_2V_{10}O_{28}] \cdot 2H_2O \cdot 2nico$, **NicoV₁₀** e $(isoH)_4[H_2V_{10}O_{28}] \cdot 2iso$, **IsoV₁₀**. A estrutura cristalina de cada composto possui dois cátions orgânicos protonados nos nitrogênios dos anéis piridínicos e duas moléculas neutras co-cristalizadas.

A associação do V₁₀ com a nicotinamida e a isonicotinamida diminuiu significativamente o potencial de inibição da P-gp, atingindo um valor de ~50% na maior concentração testada, valor inferior ao efeito observado pelo **NaV₁₀** (~80%). Adicionalmente, a nicotinamida e isonicotinamida isoladamente não promoveram nenhum efeito inibitório (FIGURA 15).

O **NicoV₁₀** e o **IsoV₁₀** foram compostos que lançaram expectativas a respeito de sua inibição, uma vez que a nicotinamida mostrou capacidade de inibição *in vitro* para P-gp, descrita por Qiu e colaboradores (2017). Neste estudo comparativo, a Nicotinamida estava presente nos compostos sintetizados a partir de 2-((piridina-4-metil)amino)nicotinamidas. Contudo, essa hipótese não foi confirmada nesse estudo.

FIGURA 15. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DE **NicoV₁₀**, **IsoV₁₀** E **NaV₁₀** FRENTE A P-gp



FONTE: O Autor (2019)

NOTA: Avaliação da capacidade de inibição dos decavanadatos (**IsoV₁₀**, **NicoV₁₀** e **NaV₁₀**) sobre a P-gp. A capacidade de inibir o transporte de rodamina 123 mediado pelo transportador P-gp foi realizada por citometria de fluxo. Células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp) foram expostas concomitantemente ao substrato Rodamina 123 (5 µM) e aos compostos isonicotinamida (Iso), nicotinamida (Nico), **IsoV₁₀**, **NicoV₁₀** e **NaV₁₀** (1,0 µM, 10 µM e 50 µM) por 30 min. A porcentagem de inibição foi determinada usando o inibidor de referência GF20918 (1,0 µM), que produz uma inibição de 100%. Controles adicionais de inibição foram realizados com células não transfectadas (wild type). Os resultados representam a média ± SD de três experimentos independentes.

Os resultados apresentados na TABELA 5 foram obtidos através das curvas de inibição variando a concentração dos compostos. Observamos

claramente que o **NicoV₁₀** e seu isômero **IsoV₁₀** não promovem uma inibição completa da rodamina 123, diferentemente do **NaV₁₀**.

TABELA 5. Potencial de Inibição dos decavanadatos associados a cátions sobre a P-gp

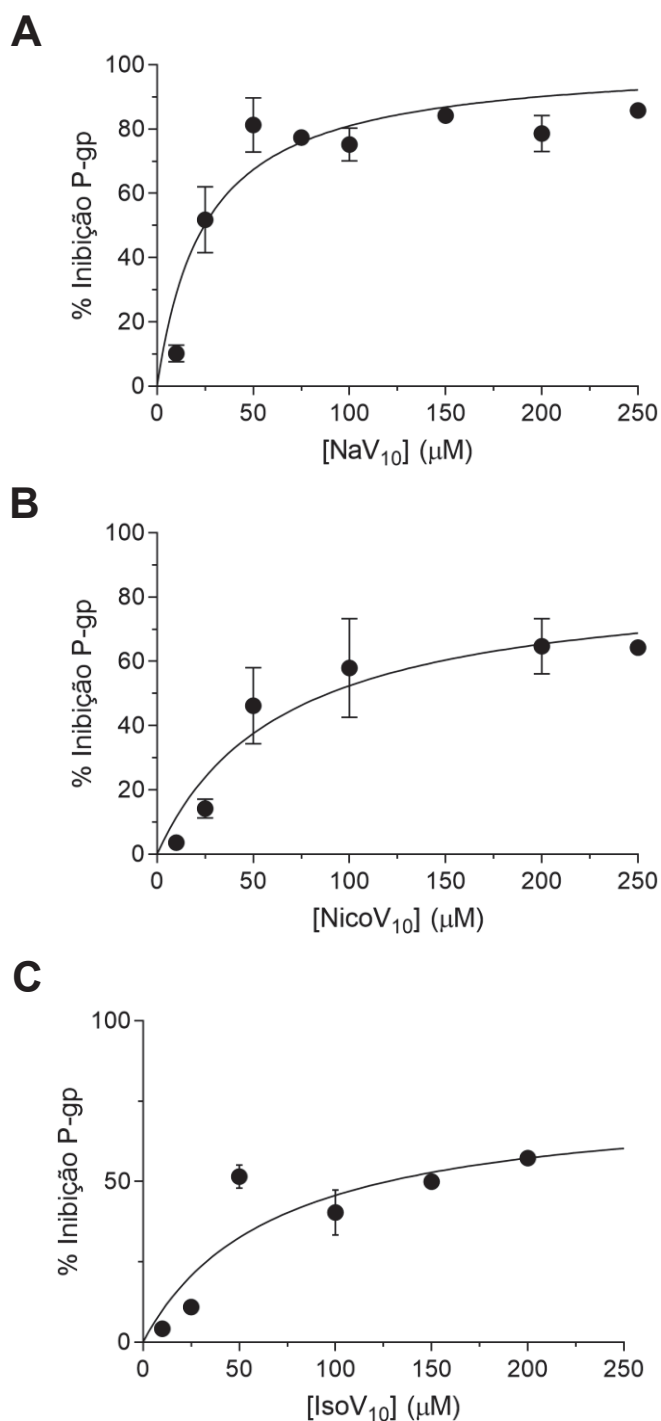
Composto	Rodamina 123	
	IC ₅₀ ± SD	I _{MAX} ± SD
NaV₁₀	25,4 ± 7,9	101,6 ± 9,6
IsoV₁₀	67,9 ± 27,4	76,7 ± 10,8
NicoV₁₀	65,6 ± 15,9	86,8 ± 6,4

Na figura 15 constatamos que a nicotinamida e a isonicotinamida, quando isoladas não produzem efeito inibitório, mas a associação de **V₁₀** a essas moléculas traz esse efeito à tona. Entretanto, a associação não se mostrou benéfica, pois o **NaV₁₀** sozinho tem um efeito de inibição superior (TABELA 5). No estudo realizado com células de *E. coli*, *Giardia intestinalis* e Vero (células de epitélio de rim de macaco verde africano), a associação dos sais de nicotinamida e isonicotinamida a **V₁₀** mostraram efeitos de inibição de crescimento superiores ou iguais ao **NaV₁₀** (MISSINA *et al.*, 2018).

Para comparar a potência de inibição entre os diferentes decavanadatos foram realizadas curvas de inibição variando a concentração. Foram testadas as concentrações de 1 até 250 µM. Os valores de IC₅₀ foram determinados considerando a concentração capaz de inibir 50% do transporte do substrato (FIGURA 16).

Os resultados sugerem que a diminuição da capacidade de inibição apresentada pelo **NaV₁₀** em relação ao **NicoV₁₀** e **IsoV₁₀** seja causada pela diluição do decavanadato com as moléculas não ativas. Desta forma, optou-se por avaliar o efeito da topologia e da variação dos estados de oxidação do vanádio em comparação com o efeito observado pelo **NaV₁₀**.

FIGURA 16. CURVAS DE IC₅₀ DE INIBIÇÃO DOS DECAVANADATOS **NaV₁₀**, **NicoV₁₀** E **IsoV₁₀** SOBRE A P-gp



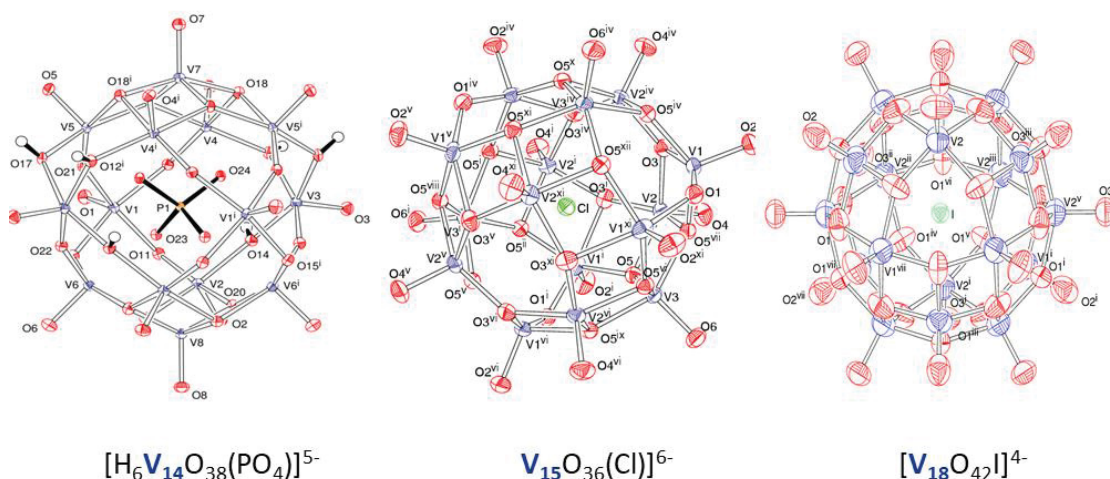
FONTE: O Autor (2019)

NOTA: Curvas de IC₅₀ de inibição dos decavanadatos **NaV₁₀**, (A) **NicoV₁₀** (B) e **IsoV₁₀** (C) sobre a P-gp. A capacidade de inibir o transporte de rodamina 123 mediado pela P-gp foi realizada por citometria de fluxo. Células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp) foram expostas concomitantemente ao substrato Rodamina 123 e aos compostos **NaV₁₀**, **NicoV₁₀** e **IsoV₁₀** (1,0 a 250 μM) por 30 min. A porcentagem de inibição foi determinada usando o inibidor de referência GF120918 (1,0 μM), que produz uma inibição de 100%. Controles adicionais de inibição foram realizados com células não transfectadas (*wild type*). Os resultados representam a média ± SD de três experimentos independentes.

6.3 EFEITO DA VARIAÇÃO DA TOPOLOGIA DOS POLIOXOVANADATOS

Dentre os polioxovanadatos mais complexos foram selecionados compostos que têm sido avaliados em diferentes atividades biológicas. Os três polioxovanadatos apresentados na figura 17 conservam a topologia pseudoesférica e variam em número de centros de vanádio, na proporção entre os dois estados de oxidação acessíveis em meio biológico (V^{IV} / V^V) e na natureza do ânion encapsulado (fosfato, cloreto e iodeto). Os códigos adotados para $K(NH_4)_4[H_6V_{14}O_{38}(PO_4)] \cdot 11H_2O$ (**V₁₄P**), $(Me_4N)_6[V_{15}O_{36}Cl]$ (**V₁₅Cl**), $(NH_4)_2(Me_4N)_6[V_{18}O_{42}]I \cdot 5H_2O$ (**V₁₈P**), refletem o número de centros de vanádio e o ânion encapsulado.

FIGURA 17. DIAGRAMA ORTEP DE **V₁₄**, **V₁₅** E **V₁₈**

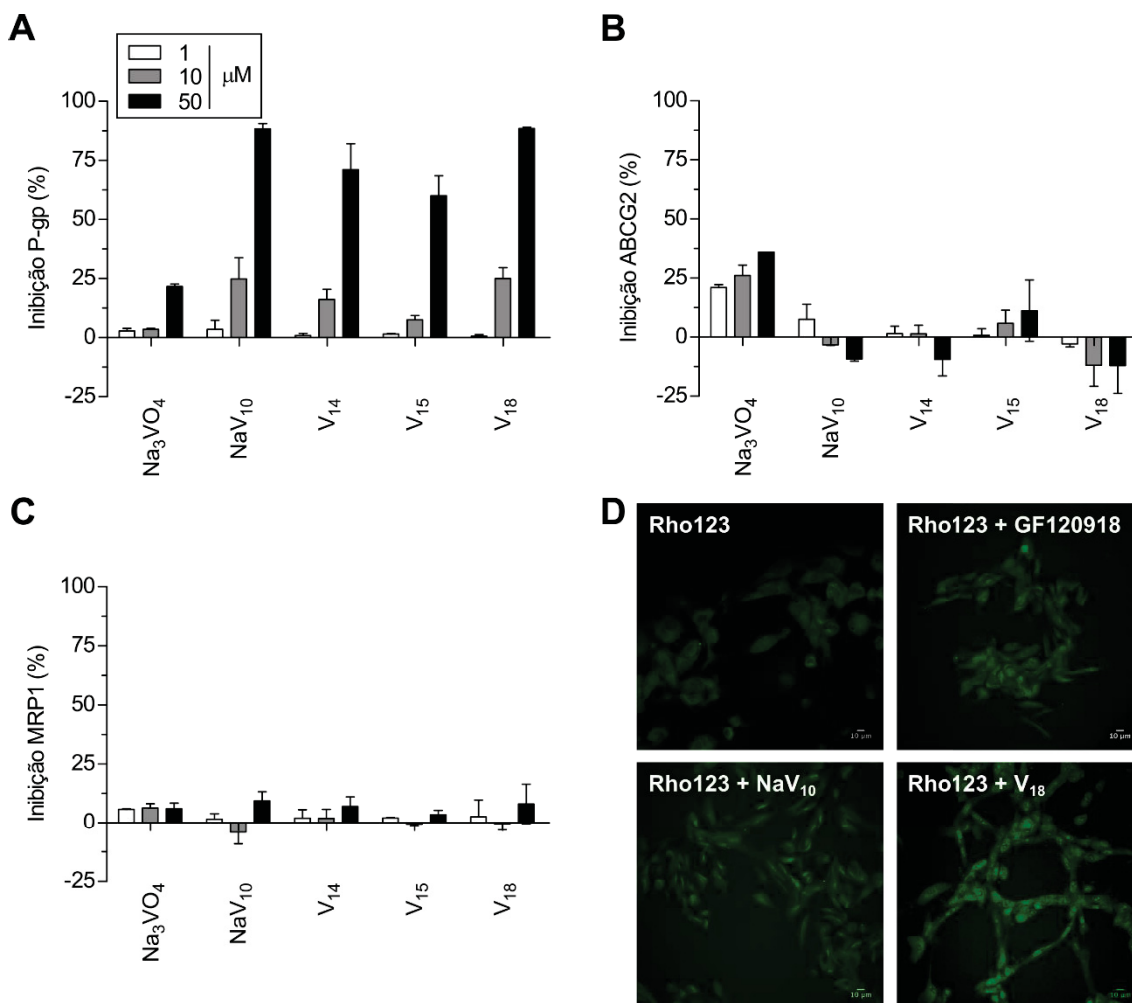


FONTE: Nunes, G.G (2018)

NOTA: Diagrama ORTEP de $K(NH_4)_4[H_6V_{14}O_{38}(PO_4)] \cdot 11H_2O$ (**V₁₄P**), $(Me_4N)_6[V_{15}O_{36}Cl]$ (**V₁₅Cl**), $(NH_4)_2(Me_4N)_6[V_{18}O_{42}]I \cdot 5H_2O$ (**V₁₈P**)

De forma análoga ao **NaV₁₀**, os compostos **V₁₄**, **V₁₅** e **V₁₈** foram capazes de inibir o transporte mediado pelo transportador P-gp na concentração de 50 μM . Uma inibição discreta, inferior a 30% foi observada na concentração de 10 μM e nenhum efeito foi observado na menor concentração testada, 1 μM (FIGURA 18A).

FIGURA 18. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DO Na_3VO_4 , NaV_{10} , V_{14} , V_{15} , V_{18} SOBRE OS TRANSPORTADORES ABC



FONTE: O Autor (2019)

NOTA: Avaliação da capacidade de inibição dos polioxovanadatos sobre os transportadores ABC. A capacidade de inibir o transporte de substratos mediados por transportadores ABC foi realizada por citometria de fluxo. **(A)** Células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp) foram expostas concomitantemente ao substrato Rodamina 123 (5,0 μM) e aos compostos (1,0 μM , 10 μM e 50 μM) por 30 min. A porcentagem de inibição foi determinada usando o inibidor de referência GF120918 (1 μM), que produz uma inibição de 100%. **(B)** Células HEK293-*ABCG2* foram expostas concomitantemente ao substrato Mitoxantrona (5,0 μM) e aos compostos (1,0 μM , 10 μM e 50 μM) por 30 min. A porcentagem de inibição foi determinada usando o inibidor de referência Ko143 (1,0 μM), que produz uma inibição de 100%. **(C)** Células BHK21-*ABCC1* (MRP1) foram expostas concomitantemente ao substrato calceína-AM (0,01 μM) e aos compostos (1, 10 e 50 μM) por 30 min. A porcentagem de inibição foi determinada usando o inibidor de referência Verapamil (30 μM), que produz uma inibição de 100%. Controles adicionais de inibição foram realizados com células não transfectadas (wild type). Os resultados representam a média \pm SD de três experimentos independentes. **(D)** Imagens de microscopia confocal em células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp) expostas concomitantemente ao substrato Rodamina 123 (5 μM) e a NaV_{10} e V_{18} (50 μM) ou com inibidor de referência GF120918 (1,0 μM) por 30 min.

Novamente foi observado um efeito seletivo de inibição para o transportador P-gp, uma vez que os transportadores ABCG2 (FIGURA 18B) e MRP1 (FIGURA 18C) não foram inibidos nem na maior concentração testada, 50 μ M.

A análise por microscopia confocal confirmou a inibição da P-gp pelos compostos **NaV₁₀** e **V₁₈**, evidenciado pelo aumento da fluorescência de rodamina 123 nas células tratadas com os polioxovanadatos, similar ao inibidor de referência GF120918 (FIGURA 18D). Os resultados foram expressos como dados qualitativos complementares. Eles oferecem uma análise visual adicional do efeito de inibição realizado pelo polioxovanadatos em relação aos controles negativo (ausência de inibidores) e positivo (presença do inibidor de referência GF 120918).

O perfil seletivo de inibição é um fator desejável na identificação de inibidores. Entretanto, alguns potentes inibidores descritos na literatura não são seletivos, a citar o Elacridar (GF120918), que é usado como inibidor de referência e inibe tanto a P-gp quanto ABCG2 (KARBOWNIK *et al.*, 2019). Além disso, normalmente os inibidores não seletivos apresentam maior afinidade por um transportador, como é o caso do GF120918, que apresenta maior afinidade para P-gp (RAO *et al.*, 2014). O tariquidar é outro exemplo, pois inibe ambos transportadores ABC, porém com maior afinidade para P-gp, quando comparado a ABCG2 (LEOPOLDO *et al.*, 2019).

Existem inibidores cuja especificidade é exclusiva para um único transportador, como é o caso do zosuquidar, um inibidor seletivo da P-gp que foi utilizado em ensaios clínicos para pacientes portadores de leucemia mieloide aguda, tratados com o quimioterápico daunorrubicina. Embora o estudo não tenha apresentado os resultados esperados, uma vez que houve uma possível interação entre o inibidor e o quimioterápico, o que tornou a dose terapêutica imprevisível, a dose de zosuquidar utilizada produzia um efeito inibitório seletivo (LANCET *et al.*, 2009).

Todos os transportadores ABC possuem o NBD como região conservada, no qual o ATP se liga. A hipótese original previa que os polioxovanadatos produziram um efeito não seletivo, uma vez que o ortovanadato inibe a atividade ATPase de todos os transportadores ABC. A inibição seletiva do **NaV₁₀**, **V₁₄**, **V₁₅** e **V₁₈** frente ao transportador P-gp refuta a

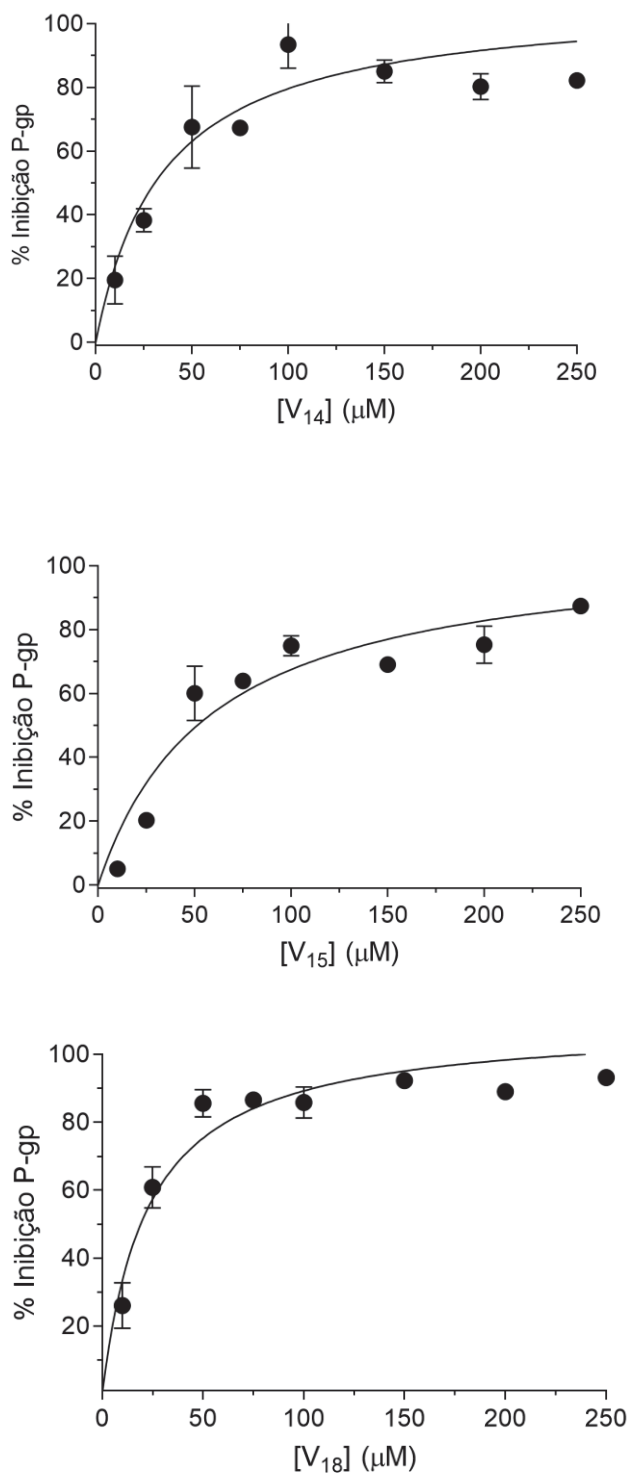
hipótese inicial do trabalho de que estes compostos atuariam de forma inespecífica.

6.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA P-gp (IC_{50}) PELOS POLIOXOVANADATOS DE VALENCIA MISTA

Após identificar a seletividade para P-gp foram determinados os valores de IC_{50} de inibição dos compostos. Assim, utilizando o substrato Rodamina 123 determinou-se quais deles teriam o melhor potencial de inibição. Na FIGURA 19 estão apresentadas as curvas de inibição dos polioxovanadatos testados. Os valores numéricos obtidos através destas curvas foram compilados e apresentados na tabela 6. Os valores de IC_{50} de inibição variaram de 22 μ M a 67 μ M. Dentre os compostos testados, o **NaV₁₀** e o **V₁₈** apresentaram os melhores resultados, com valores de IC_{50} de 25,4 e 22,7 μ M respectivamente.

Os inibidores podem ser classificados como inibidores completos ou incompletos, com base no valor de inibição máxima ($I_{MÁX}$), que correspondente ao valor máximo de inibição em porcentagem. Inibidores incompletos apresentam $I_{MÁX} \leq 80\%$ e inibidores completos apresentam $I_{MÁX} \geq 80\%$. Todos os compostos, incluindo o **NaV₁₀** e o **V₁₈** foram capazes de inibir até 100% do efluxo de rodamina 123 na concentração de 50 μ M.

FIGURA 19. CURVAS DE IC₅₀ DE INIBIÇÃO DO V₁₄, V₁₅ E V₁₈ SOBRE A P-gp



FONTE: O Autor (2019)

NOTA: Curvas de IC₅₀ de inibição dos polioxovanadatos de valência mista sobre a P-gp. A capacidade de inibir o transporte de rodamina 123 pela P-gp foi realizada por citometria de fluxo. Células NIH3T3-ABCB1 (P-gp) foram expostas concomitantemente ao substrato (Rodamina 123 a 5,0 μM) e aos compostos (1,0 a 250 μM) por 30 min.

TABELA 6. Potencial de Inibição (IC_{50}) dos polioxovanadatos de valência mista comparados com o **NaV₁₀**

Composto	Rodamina 123		Mitoxantrona	
	IC_{50} (μ M) \pm SD	I_{MAX} (μ M) \pm SD	IC_{50} (μ M) \pm SD	I_{MAX} (μ M) \pm SD
NaV₁₀	25,4 \pm 7,9	101,6 \pm 9,6	36,8 \pm 13,6	87,6 \pm 10,9
V₁₄	35,6 \pm 8,3	107,9 \pm 8,1	n.d.	n.d.
V₁₅	58,8 \pm 16,9	107,2 \pm 11,4	n.d.	n.d.
V₁₈	22,7 \pm 3,6	109,5 \pm 5,4	3,9 \pm 1,9	64,6 \pm 6,1

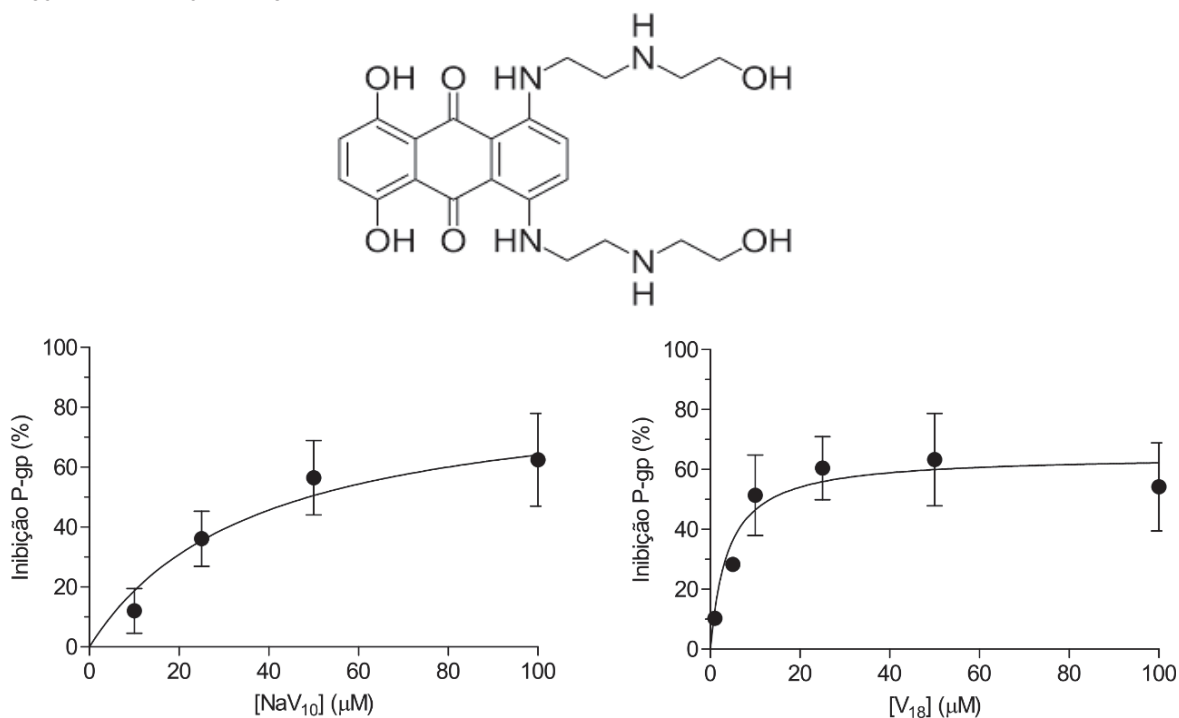
Nota: Os valores de IC_{50} , I_{MAX} e os respectivos desvios padrão (SD) de cada composto foram obtidos através de curvas de Michaelis-Menten (Best-fit values) usando o software GraphPad Prism. O valor de IC_{50} corresponde à concentração necessária para inibir 50% do efluxo do substrato, considerando o máximo de 100% de inibição. O valor de I_{MAX} corresponde a inibição máxima promovida por cada compostos, considerando como 100% de inibição o valor produzido pelo inibidor de referência GF120918 (1,0 μ M). * n.d. não realizado.

6.5 AVALIAÇÃO DA MUDANÇA DO SUBSTRATO SOBRE O EFEITO DE INIBIÇÃO DA P-gp PELOS POLIOXOVANADATOS

Os resultados apresentados até aqui foram obtidos utilizando a rodamina 123 como substrato. A rodamina123 é o substrato mais empregado por não ser tóxico para as células (SAENKHAE *et al.*, 2014). Para verificar se os resultados de inibição obtidos com os polioxovanadatos poderiam ser expandidos para outros substratos da P-gp, a rodamina 123 foi substituída pela mitoxantrona. A mitoxantrona é o quimioterápico mais conhecido da classe das antraciclinas, empregado clinicamente em vários esquemas de tratamento de câncer, destacando o câncer de mama, linfomas e mielomas (MEGÍAS-VERICAT, 2018).

A inibição do transporte de mitoxantrona foi avaliada apenas com os dois melhores inibidores, **NaV₁₀** e **V₁₈**. Como pode ser observado nas curvas de IC_{50} (FIGURA 20) e na tabela 6, a inibição não foi completa, mesmo em altas concentrações, diferindo do resultado com o substrato rodamina 123. Além disso, foi observada uma diminuição de aproximadamente 6 vezes no valor de IC_{50} para o **V₁₈** (22,7 μ M para rodamina 123 *versus* 3,9 μ M para mitoxantrona). Contudo, o mesmo perfil não foi observado para o **NaV₁₀** (IC_{50} de 25,4 μ M para rodamina 123 *versus* IC_{50} de 36,8 μ M para mitoxantrona).

FIGURA 20. ESTRUTURA QUÍMICA DA MITOXANTRONA E CURVAS DE IC₅₀ DE **NaV₁₀** E **V₁₈** COM ESSE SUBSTRATO



FONTE: O Autor (2019)

NOTA: Estrutura química da mitoxantrona e curvas de IC₅₀ de inibição dos polioxovanadatos sobre a P-gp. A capacidade de inibir o transporte de mitoxantrona mediado pela P-gp foi realizada por citometria de fluxo. Células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp) foram expostas concomitantemente mitoxantrona (5,0 μM) e aos compostos **NaV₁₀** e **V₁₈** (1 a 250 μM) por 30 min. Inibição do transporte de mitoxantrona (5,0 μM). A porcentagem de inibição foi determinada usando o inibidor de referência GF120918 (1,0 μM), que produz uma inibição de 100%. Controles adicionais de inibição foram realizados com células não transfectadas (wild type). Os resultados representam a média ± SD de três experimentos independentes.

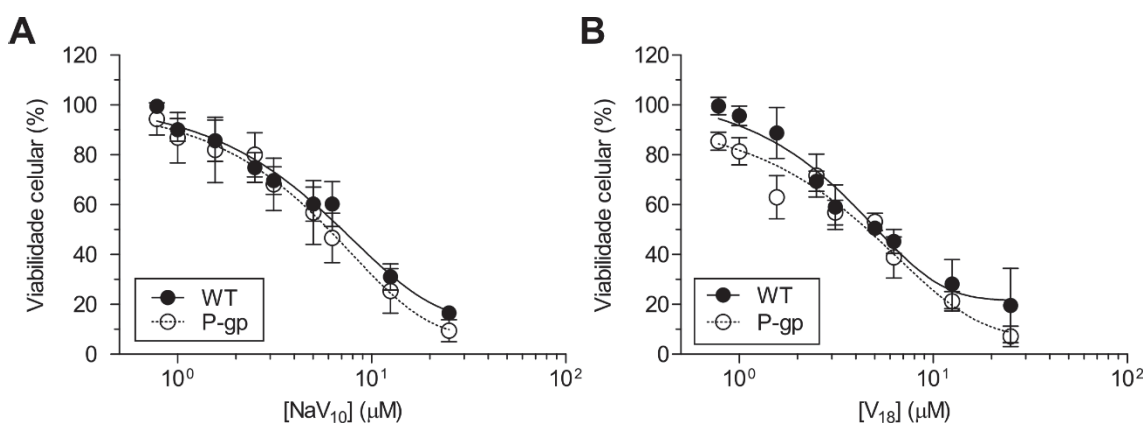
Esse comportamento talvez se relacione ao fato de que a P-gp tem mais de um sítio de ligação. A literatura atual descreve o sítio de ligação da rodamina 123, porém o sítio de ligação da mitoxantrona ainda não foi bem documentado, devido a poliespecificidade desse transportador e presença de outros sítios hipotéticos de ligação (CHUFAN, AMBUDKAR, 2015). Ainda, podemos levantar a hipótese de que a mitoxantrona e a rodamina 123 ligam-se a sítios diferentes em razão dos diferentes comportamentos dos inibidores testados como é mostrado na tabela 6.

6.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E AUSÊNCIA DE TRANSPORTE DE NaV_{10} E V_{18}

Muitos inibidores de transportadores ABC competem pelo sítio de substrato e são conseqüentemente transportados, inviabilizando sua utilidade clínica. Quando existe uma competição entre o substratos e inibidores pelo mesmo sítio, a capacidade de inibição pode ser alterada (WANG et al., 2000). Uma das formas para avaliar o transporte de compostos é comparar o efeito citotóxico em concentrações crescentes em células que expressam o transportador em paralelo ao efeito sobre a linhagem controle, que não expressa.

O efeito citotóxico do NaV_{10} e do V_{18} foi avaliado em células que expressam a P-gp (NIH3T3-*ABCB1*) e células controle (NIH3T3-WT). As células foram expostas ao inibidor em concentrações de 0,78 a 25 μM por 24 h. Foi observado que o perfil de citotoxicidade foi similar nas duas linhagens, quando tratadas em concentrações crescentes de NaV_{10} ou V_{18} (FIGURA 21). Esse resultado sugere que os polioxovanadatos não são transportados pela P-gp.

FIGURA 21. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NaV_{10} E V_{18} FRENTE A P-gp



FONTE: O Autor (2019)

NOTA: Avaliação da citotoxicidade e transporte do NaV_{10} e V_{18} . A citotoxicidade do NaV_{10} e V_{18} foi avaliada em células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp) e células controle não transfectadas (wild type), células NIH3T3 WT. A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT após 24 h de tratamento com os compostos. (A) Citotoxicidade do NaV_{10} . (B) Citotoxicidade do V_{18} . A porcentagem de células viáveis foi determinada comparando com a condição não tratada, considerada como 100%. Os resultados representam a média \pm SD de três experimentos independentes.

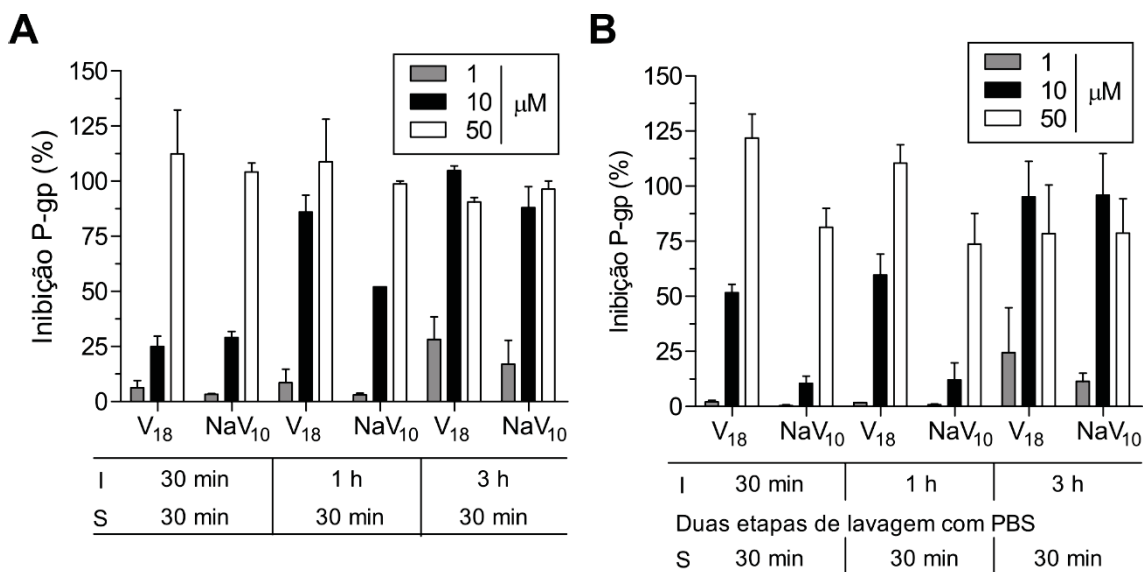
O resultado de ausência de transporte do inibidor é desejável, uma vez que aumenta seu potencial de uso clínico. Existem inibidores da P-gp, como os de primeira geração, que tinham como uma de suas limitações seu transporte ao longo do tempo, como por exemplo a Ciclosporina A e o verapamil (AMIN, 2013).

6.7 POTENCIAL DE INIBIÇÃO DO **NaV₁₀** E DO **V₁₈** AO LONGO DO TEMPO

Para avaliar se a performance de inibição dos polioxovanadatos era tempo dependente, um ensaio de inibição com o **NaV₁₀** e **V₁₈** foi realizado em tempos variados. O ensaio padrão de inibição é realizado em 30 min, com incubação concomitante do inibidor e do substrato rodamina 123. Para avaliar o efeito do tempo em relação à potência de inibição, os compostos foram incubados nos tempos de 30 min, 1 h e 3 h. É importante notar que o substrato foi adicionado nos 30 min finais de incubação, mimetizando a condição padrão.

Conforme apresentados na FIGURA 22A, ambos os polioxovanadatos na concentração de 50 μ M foram capazes de inibir completamente o efluxo da rodamina 123. Entretanto, em concentrações inferiores, principalmente na concentração de 10 μ M, fica evidente um efeito dependente do tempo, sendo que com 3 horas de incubação a inibição atingiu 100% para os dois compostos. A mesma tendência foi observada com a concentração de 1 μ M, porém nesse caso a inibição não ultrapassou 30%, mesmo após 3 h de incubação (FIGURA 22A).

FIGURA 22. INIBIÇÃO DA P-gp AO LONGO DO TEMPO E ENSAIO DE LAVAGEM



FONTE: O Autor (2019)

NOTA: Potencial de inibição do **NaV₁₀** e **V₁₈**. A capacidade de inibir o transporte de Rodamina 123 (5 μM) mediado pela P-gp foi realizada por citometria de fluxo usando células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp). A porcentagem de inibição foi determinada usando o inibidor de referência GF120918 (1,0 μM), que produz uma inibição de 100%. **(A)** Potencial de inibição do **NaV₁₀** e **V₁₈** após incubação com inibidor em diferentes períodos. As células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp) foram expostas por 30 min, 1h e 3h. Após esse período de incubação com os inibidores **NaV₁₀** e **V₁₈**, as células foram incubadas com o substrato Rho123(5,0 μM) por 30 min. **(B)** Potencial de inibição do **NaV₁₀** e **V₁₈** após incubação com inibidor em diferentes períodos e subsequente etapa de remoção do inibidor do meio de cultura. As células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp) foram expostas por 30 min, 1h e 3h. Após esse período de incubação com os inibidores **NaV₁₀** e **V₁₈**, as células foram lavadas duas vezes com PBS e subsequentemente incubadas com o substrato rodamina123 por 30 min. Os resultados representam a média ± SD de três experimentos independentes.

Adicionalmente foi explorado se a remoção dos compostos do meio de cultivo antes da adição do substrato fluorescente afetaria a inibição. Foram realizadas duas etapas de lavagem das células com PBS após cada tempo de exposição aos compostos (30 min, 1 e 3 h). Como evidenciado na figura 22B, as etapas de lavagem não afetaram a inibição do transporte da rodamina 123 (FIGURA 22B). Compostos que são transportados, ou que se ligam fracamente aos seus alvos tendem a diminuir sua potência de inibição ao longo do tempo. Esse resultado corrobora com a ausência de transporte evidenciada nos estudos de citotoxicidade.

A ausência de efeito sobre a potência de inibição após as duas etapas de lavagem sugere que os compostos entram nas células, ou se acumulam em algum sítio de ligação da proteína. A literatura é bem controversa ao falar da

entrada do decavanadato na célula devido ao seu tamanho e alta carga superficial. No entanto, o polioxoânion já foi encontrado no citoplasma celular e há vários estudos que demonstram que este sofre interação com a mitocôndria. Há bastante especulação sobre a estabilidade do V_{10} no meio extracelular, e afirma-se que este se quebra formando as espécies de menor nuclearidade $[H_2VO_4]^-$ (V_1), $[HV_2O_7]^{3-}$ (V_2), $[V_4O_{12}]^{4-}$ (V_4) e $[V_5O_{15}]^{5-}$ (V_5). As hipóteses mais ousadas sugerem que estas espécies de menor nuclearidade poderiam permear a membrana celular, formando novamente o V_{10} em compartimentos mais ácidos da célula (AURELIANO, OHLIN, 2014).

Vários autores estudam a interação do V_{10} com modelo de membrana biológica na tentativa de elucidar seu modo de interação, no entanto, embora avanços significativos tenham sido feitos, este ainda permanece uma questão em aberto. Embora o sítio de ligação e a natureza desta interação ainda não sejam conhecidos, a alta carga superficial dos polioxovanadatos poderia gerar interações eletrostáticas fortes com componentes celulares carregados positivamente. Os grupos oxo terminais ($V=O$) e em ponte ($\mu-V-O$) presentes nas estruturas dos polioxovanadatos podem ainda participar de interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio com grupos aceptores de densidade eletrônica, justificando a estabilidade da interação POV-P-gp.

6.8 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE INIBIÇÃO

Para entender melhor o mecanismo de inibição promovido pelos polioxovanadatos foi avaliado o efeito da variação da concentração de rodamina123 (1, 2.5, 5, 10 e 20 μM) e dos inibidores (0, 10, 25 e 50 μM). A partir dos resultados de fluorescência em unidades arbitrárias foram traçados os gráficos de duplo recíproco apresentados na figura 23. Através dessa análise foi possível determinar os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m para cada inibidor.

Através dessa abordagem foi possível identificar uma inibição do tipo não competitiva, uma vez que o K_m aparente não foi alterado em concentrações diferentes de inibidor e que a inclinação K_m/V_{max} foi maior em concentrações crescentes de inibidor (GRANT, 2018).

FIGURA 23. GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK PARA **NaV₁₀** E **V₁₈**

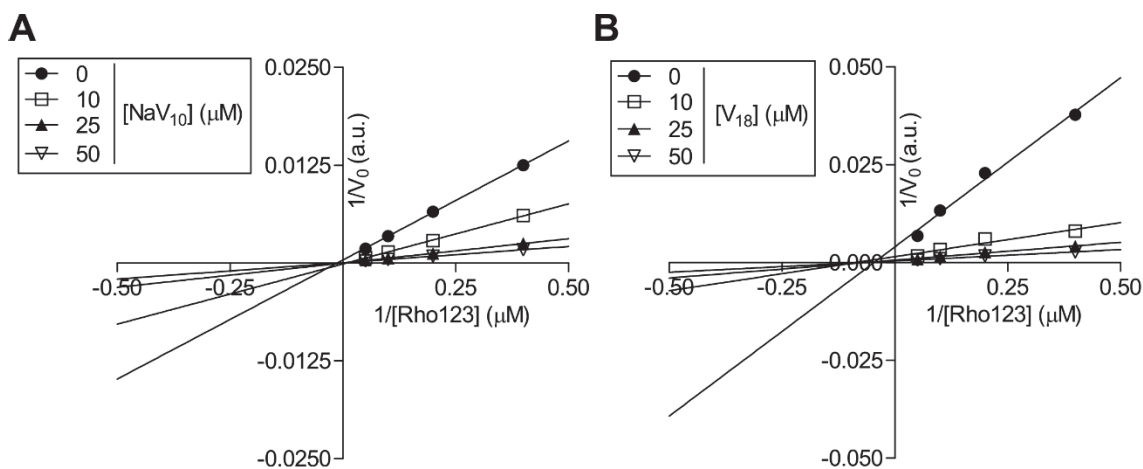


FIGURA 21: Mecanismo de inibição do **NaV₁₀** e **V₁₈**. **(A e B)** Os valores foram obtidos a partir do acúmulo intracelular de rodamina 123 por citometria de fluxo em células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp). Os dados foram linearizados conforme o método de Lineweaver-Burk para que fosse apresentado um gráfico do tipo duplo recíproco e os resultados, expressos como unidades arbitrárias de fluorescência normalizados pelo controle.

A inibição não competitiva é característica de inibidores que não competem pelo sítio de ligação do substrato, no caso, o sítio de rodamina 123 da P-gp não é ocupado pelo **V₁₈** ou **NaV₁₀**.

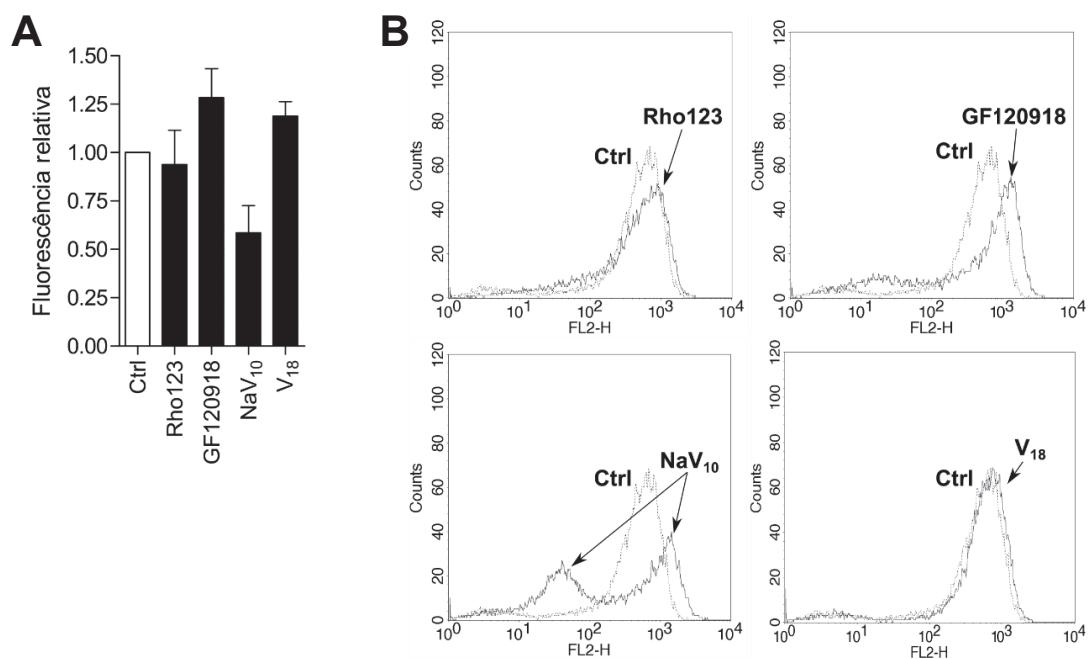
6.9 SÍTIOS DE LIGAÇÃO DOS POLIOXOVANADATOS NA P-gp

Foi avaliado o efeito dos polioxovanadatos **NaV₁₀** e **V₁₈** sobre a ligação do anticorpo conformacional 17F9 (KIMCHI-SARFATY ET AL., 2007). Esse anticorpo reconhece uma região extracelular da proteína-gp. Na figura 24A estão representados os resultados, comparando as medianas de fluorescência. Na 24B temos o os histogramas representativos. Os resultados demonstram que o **NaV₁₀** foi capaz de induzir dois efeitos distintos, caracterizados por duas populações de células (FIGURA 24B). Em uma população foi observado um aumento no reconhecimento do anticorpo conformacional, de forma similar ao apresentado pelo inibidor de referência GF120918. Contudo, uma população de células apresentou efeito oposto, onde existe uma diminuição do reconhecimento pelo anticorpo 17F9, sugerindo mais de um sítio de ligação do **NaV₁₀** na P-gp. A diminuição do reconhecimento do anticorpo sugere que o

NaV₁₀ pode estar interagindo com a proteína de forma a bloquear a ligação do anticorpo ou que a ligação do **NaV₁₀** a proteína diminui a exposição desta ao anticorpo de uma forma drástica, porém, o aumento sugere que o composto entrou na célula ou altera a conformação de forma a aumentar a exposição da P-gp ao anticorpo conformacional.

O **V₁₈** apresentou o mesmo perfil que a condição controle (FIGURA 24B), nesse caso, parece que o contato do **V₁₈** com a P-gp não altera em nada a sua conformação. Em conjunto, esses resultados sugerem fortemente que o **NaV₁₀** e **V₁₈** se ligam em diferentes sítios na P-gp.

FIGURA 24. O EFEITO DOS POLIOXOVANADATOS **NaV₁₀** E **V₁₈** SOBRE A LIGAÇÃO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 17F9 NA P-gp



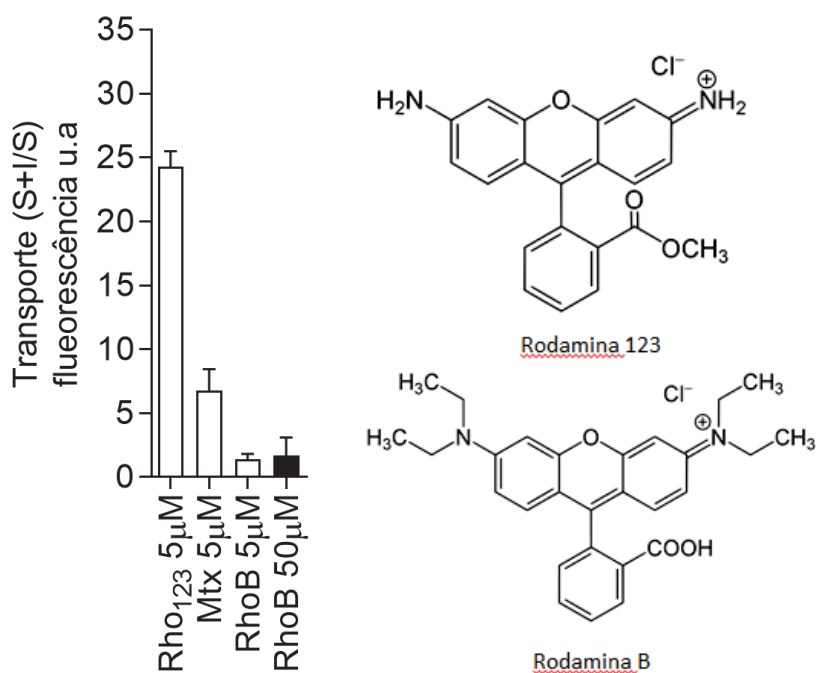
FONTE: O Autor (2019)

NOTA: Mecanismo de inibição do **NaV₁₀** e **V₁₈** (**A**) Células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp) foram expostas por 30 min à concentração de 50 μ M do NaV₁₀ e V₁₈. Um controle com GF120918 (1,0 μ M) foi realizado. Após exposição aos poliovanadatos as células foram incubadas com o anticorpo conformacional anti-P-gp 17F9 e posteriormente com o anticorpo secundário conjugado com PE. Os resultados representam a média \pm SD de três experimentos independentes. (**B**) Resultado de citometria de fluxo representativo.

6.10 COMPORTAMENTO DA RODAMINA 123 E RODAMINA B SOBRE A P-gp

Em 1997, um estudo feito por Eitan e colaboradores descreveu o uso de rodaminas (trimetilrosamina, as rodaminas I e II, a rodamina-B, a rodamina 6G e a rodamina 123) como substratos da P-gp. Nesse estudo a rodamina123 foi descrita como um eficiente substrato da P-gp. Por outro lado, a rodamina B não foi transportada pela P-gp (EYTAN et al., 1997). As principais diferenças estruturais entre a rodamina B e a rodamina 123 encontram-se nos substituintes do grupamento fluoróforo determinado pelos anéis aromáticos, conforme apresentado na figura 25.

FIGURA 25. O COMPORTAMENTO DOS SUBSTRATOS FLUORESCENTES FRENTE A P-gp



FONTE: O Autor (2019)

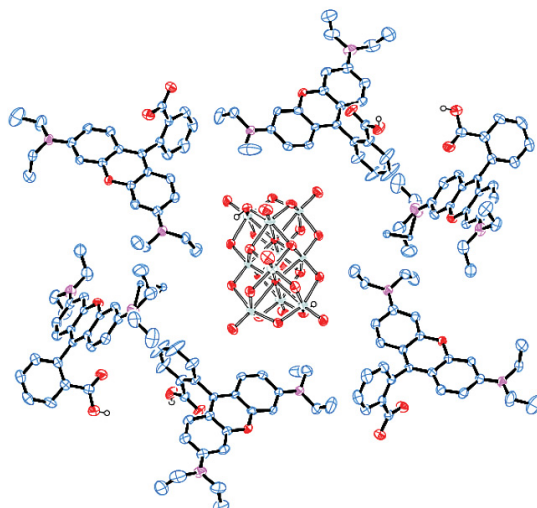
NOTA: O transporte de rodamina 123 (Rho123), mitoxantrona (Mtx) e rodamina B (RhoB) foi avaliado por citometria de fluxo. Células NIH3T3-ABCB1 (P-gp) foram expostas aos compostos fluorescentes na ausência ou presença de inibidor GF120918 (1 µM). "S" corresponde ao valor da mediana de fluorescência da condição controle, apenas com a sonda fluorescente. "I_{Ref}" corresponde ao valor da mediana de fluorescência da condição com a sonda fluorescente e o inibidor de referência GF120918 (1 µM).

A figura 25 mostra a variação da capacidade de transporte de três compostos (rodamina 123, mitoxantrona e rodamina B) pela P-gp. Pode-se

observar que a rodamina 123 e a mitoxantrona são transportadas pela P-gp. Além disso, claramente a rodamina 123 é melhor transportada que a mitoxantrona. Esses resultados estão de acordo com a literatura, que descreve ambos compostos como substratos da P-gp. Em contrapartida, a rodamina B não foi transportada, mesmo em altas concentrações (50 μM). Esse resultado também está de acordo com a literatura e demonstra que a rodamina B pode ser considerada uma sonda fluorescente que se acumula de forma concentração dependente dentro da célula, porém não é transportada pela P-gp (EYTAN, 1997).

Após confirmar que a rodamina B não é transportada pela P-gp foi realizada a síntese de um decavanadato associado a este fluoróforo. O grupo de síntese inorgânica da UFPR, parceiro deste trabalho, sintetizou um o composto de fórmula $(\text{RodBH})_4[\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot (\text{RodB})_2 \cdot 13\text{H}_2\text{O}$. A estrutura deste composto, determinada por difratometria de raios X de monocristal (FIGURA 26), evidencia que o decavanadato encontra-se duplamente protonado, apresentando quatro unidades catiônicas de rodamina B (RodBH^+) como contraíon. A rede cristalina é completada por duas unidades restantes de rodamina B, que apresentam o grupamento carboxila desprotonado (RodB), tornando-as neutras, e treze moléculas de água.

FIGURA 26. O DIAGRAMA ORTEP DA ESTRUTURA DE **RhoBV₁₀**

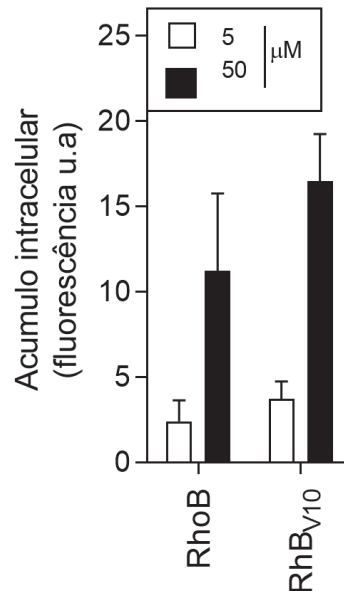


FONTE: Nunes, G.G (2018)

NOTA: Diagrama ORTEP de $(\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3)_2(\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3)_4[\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 13\text{H}_2\text{O}$ (I). As moléculas de água de cristalização e os átomos de hidrogênio não pertencentes ao decavanadato e aos grupamentos carboxila protonados foram omitidos para facilitar a visualização.

Tanto a rodamina B sozinha (RhoB) quanto a associação **RhoBV₁₀** acumulam de forma dependente da concentração dentro das células (FIGURA 27).

FIGURA 27. O ACÚMULO CELULAR DE RhoB E **RhoBV₁₀**

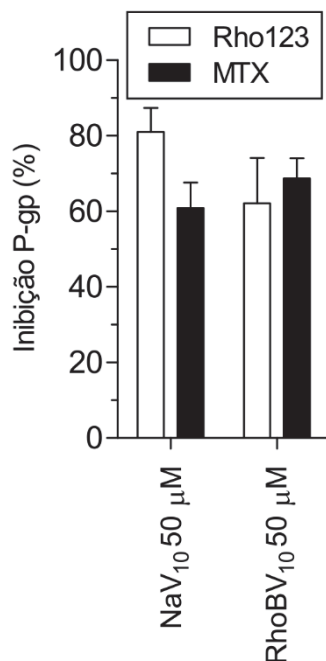


FONTE: O Autor (2019)

NOTA: O acúmulo intracelular de rodamina B (RhoB) e do complexo **RhoBV₁₀** foram avaliados por citometria de fluxo frente ao transportador P-gp. Controles adicionais de inibição foram realizados com células não transfectadas (wild type). Os resultados representam a média ± SD de três experimentos independentes.

Para avaliar se o acúmulo intracelular detectado na condição testada com o **RhoBV₁₀** não é apenas da rodamina B, foi realizado um ensaio de inibição do transporte dos substratos rodamina 123 e mitoxantrona, após o tratamento com **RhoBV₁₀**. Conforme apresentado na figura 28, a **RhoBV₁₀** foi capaz de inibir o efluxo de ambos os substratos, na mesma potência que o **NaV₁₀**.

FIGURA 28. A CAPACIDADE DE INIBIR O TRANSPORTE DE RODAMINA 123 (RHO123) E MITOXANTRONA (MTX) UTILIZANDO **NaV₁₀** OU **RhoBV₁₀**



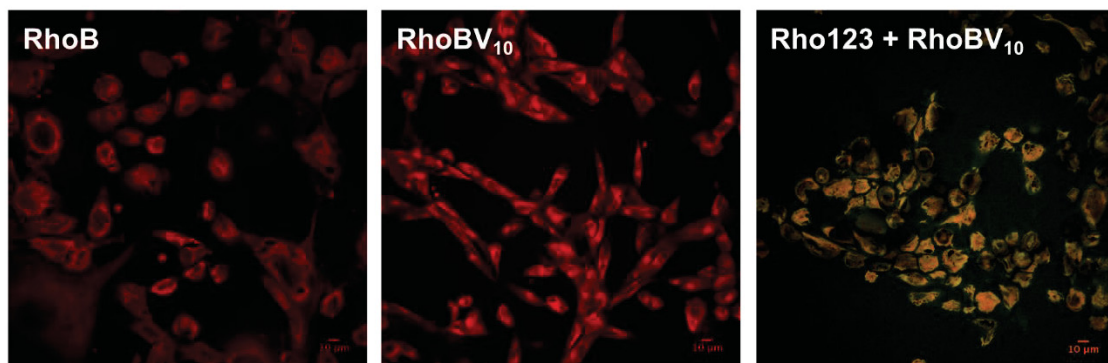
FONTE: O Autor (2019)

NOTA: A capacidade de inibir o transporte de rodamina 123 (Rho123) e mitoxantrona (MTX) mediado pela P-gp foi realizada por citometria de fluxo. Células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp) foram expostas concomitantemente ao substrato (Rodamina 123 ou mitoxantrona) e ao **NaV₁₀** e ao complexo **RhoBV₁₀** (50 μM) por 30 min. A porcentagem de inibição foi determinada usando o inibidor de referência GF120918 (1,0 μM), que produz uma inibição de 100%. Controles adicionais de inibição foram realizados com células não transfectadas (*wild type*). Os resultados representam a média ± SD de três experimentos independentes.

O acúmulo intracelular da rodamina B sozinha e do **RhoBV₁₀** foi confirmado por outra técnica, microscopia confocal (FIGURA 29). As imagens revelam um acúmulo intracelular similar da rodamina B sozinha e complexada no **RhoBV₁₀**. Além disso, podemos observar um acúmulo de rodamina 123 quando as células foram incubadas com o **RhoBV₁₀**, confirmando o resultado obtido por citometria de fluxo. Esses resultados em conjunto sugerem que a associação **RhoBV₁₀** é capaz de atravessar a membrana plasmática e se acumular dentro da célula, se ligando na P-gp e inibindo o transporte de substratos mediado por essa proteína.

Este resultado é preliminar e estudos mais aprofundados precisam ser realizados para confirmar essa hipótese, pois até o momento não existem evidências claras de que os polioxovanadatos sejam capazes de penetrar a membrana celular devido ao seu tamanho e alta carga superficial negativa.

FIGURA 29. MICROSCOPIA CONFOCAL COM AS CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM P-gp EXPOSTAS A RhoB, **RhoBV₁₀** E **RhoB** + **RhoV₁₀** + Rho123

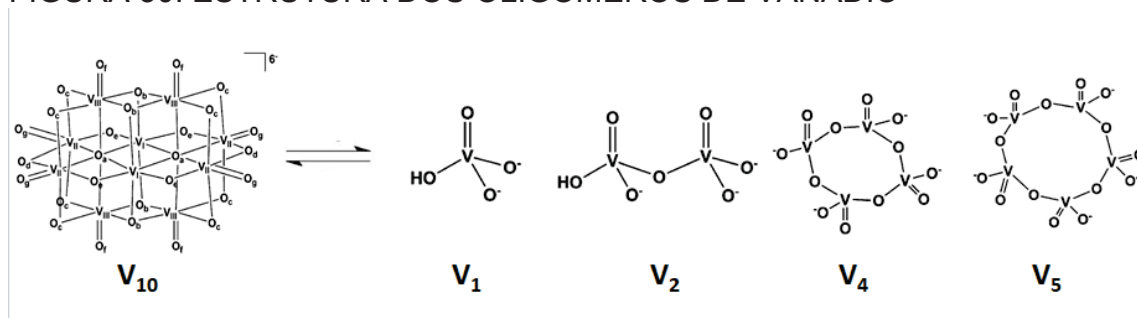


FONTE: O Autor (2019)

NOTA: Imagens de microscopia confocal em células NIH3T3-*ABCB1* (P-gp) expostas a rodamina B (RhoB), ao complexo **RhoBV₁₀** e concomitantemente ao substrato Rodamina 123 (5 µM) e complexo **RhoBV₁₀** por 30 min na concentração de 5 µM cada composto.

Adicionalmente, o ânion decavanadato pode sofrer quebra da estrutura polinuclear, formando outras espécies de menor nuclearidade em solução, como as apresentadas na figura 30. Este tipo de equilíbrio entre diferentes espécies de vanádio(V) em solução já é bem documentado na literatura. Para avaliar esta possibilidade de quebra, estudos de Ressonância Magnética Nuclear de vanádio (RMN de ⁵¹V) em condições similares as adotadas nos ensaios biológicos deverão ser realizados.

FIGURA 30. ESTRUTURA DOS OLIGOMEROS DE VANÁDIO



FONTE: NUNES, 2019

NOTA: Estruturas dos oligômeros de vanádio $[HVO_4]^{2-}$ (**V₁**), $[HV_2O_7]^{3-}$ (**V₂**), $[V_4O_{12}]^-$ (**V₄**), $[V_5O_{15}]^-$ (**V₅**) e $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ (**V₁₀**).

Estas espécies poderiam ainda reagir com os componentes do meio de cultura formando complexos em solução, que seriam em princípio, mais

lipossolúveis e poderiam permear mais facilmente a membrana celular. Trabalhos recentes demonstram a reatividade destas espécies com fosfato inorgânico e com componentes do meio que possam atuar como quelantes (SAMART et al., 2018).

Atualmente são descritos efeitos biológicos para os polioxovanadatos que variam desde a ação anticâncer até atividades antibacteriana, antiviral e antidiabética. As tentativas de avaliar os mecanismos realizados até o momento sugerem que o modo de ação desta classe de compostos seja extracelular, inibindo a ação de diferentes famílias de enzimas como as fosfatases, cinases, sulfotransferases, sialiltransferases e ecto-nucleases, as quais são localizadas na membrana plasmática e possuem pelo menos um sítio de ligação extracelular (LEE et al., 2015).

Podemos observar que o **RhoBV₁₀** promoveu uma inibição incompleta, não atingindo 100% (FIGURA 28), mesmo perfil apresentado pelo **IsoV₁₀** e **NicoV₁₀** (FIGURA 15). Esse resultado confirma que alguns cátions orgânicos podem interferir no potencial de inibição dos polioxovanadatos. Embora muitos estudos biológicos tenham sido realizados com polioxovanadatos, e em especial com o ânion decavanadato, ainda existem muitas perguntas que estão no aguardo de respostas satisfatórias.

7. CONCLUSÕES

A hipótese inicial foi baseada no desenvolvimento de inibidores não específicos dos transportadores ABC, tendo como o alvo a região conservada dos transportadores, os NBDs. Os resultados refutaram essa hipótese original e todos os polioxovanadatos testados atuaram como inibidores seletivos do transportador P-gp. Os polioxovanadatos mais promissores foram o **NaV₁₀** e **V₁₈**. Os compostos não foram transportados pela P-gp, que somado ao fato de sua solubilidade em água os tornam bastante promissores para futuros ensaios em modelo animal.

Um elegante conjunto de dados, incluindo ensaios de lavagem, acúmulo ao longo do tempo, tipo de inibição e uso de um anticorpo que reconhece a região extracelular da proteína, sugere que os polioxovanadatos entram nas células para produzir seu efeito biológico. Essa hipótese foi explorada adicionalmente através do uso de um complexo com rodamina B. Apesar de inicial, esse trabalho é o primeiro a descrever os polioxovanadatos como inibidores da P-gp e usar essa atividade biológica como modelo para explorar o mecanismo desses compostos.

8. PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito dos polioxovanadatos sobre a atividade ATPase da P-gp e comparar com ABCG2;
- Avaliar a capacidade de reversão da resistência a quimioterapia mediada pela P-gp em ensaios de viabilidade celular;
- Avaliar o efeito dos polioxovanadatos sobre a expressão da P-gp;
- Identificar qual é o tempo necessário para atingir o acúmulo intracelular máximo dos polioxovanadatos;
- Identificar as espécies que são produzidas em meio de cultivo celular e extratos de células.

9. REFERÊNCIAS

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. 5337–5339, 1998.

AMBUDKAR, S. V et al. Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 18, p. 8472–8476, 1992.

AMIN, L. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. **Drug Target Insights**, v. 7, p. 27–34, 2013.

AURELIANO, M. Decavanadate Toxicology and Pharmacological Activities : V 10 or V 1 , Both or None ? v. 2016, n. Iv, p. 15–17, 2016.

AURELIANO, M.; CRANS, D. C. Decavanadate (V10 O286 -) and oxovanadates: Oxometalates with many biological activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 536–546, 2009.

AURELIANO, M.; OHLIN, C. A. Decavanadate in vitro and in vivo effects: Facts and opinions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 137, p. 123–130, 2014.

BAR-ZEEV, M.; LIVNEY, Y. D.; ASSARAF, Y. G. Targeted Nanomedicine for Cancer Therapeutics: Towards Precision Medicine Overcoming Drug Resistance. **Drug Resistance Updates**, 2017.

BÁRSONY, O. et al. OPEN A single active catalytic site is sufficient to promote transport in P-glycoprotein. **Nature Publishing Group**, p. 1–16, 2016.

BISHAYEE, A. et al. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: The in vivo evidence. **Cancer Letters**, v. 294, n. 1, p. 1–12, 2010.

BOUMENDJEL, A. et al. Targeting the Multidrug ABCG2 Transporter with Flavonoidic Inhibitors: In Vitro Optimization and In Vivo Validation. **Curr Med Chem**, v. 18, p. 3387–3401, 2011.

BRANCH, C. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. **The Oncologist**.v 8. p. 411–424, 2003.

CANTLEY, C. L. et al. Communication Vanadate Is a Potent (Na , K) -ATPase Found in ATP Derived from Muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 252, p. 7421–7423, 1977.

CARDARELLI, C. O. et al. Differential effects of P-glycoprotein inhibitors on NIH3T3 cells transfected with wild-type (G185) or mutant (V185) multidrug transporters\rlInhibition of SK3 channels in the TE671 human medulloblastoma cell line by desipramine and imipramine. **Cancer Research**, v. 55, n. 5, p. 1086–1091, 1995.

CHANG, G. Multidrug resistance ABC transporters. **FEBS Letters**, v. 555, n. 1, p. 102–105, 2003.

CHANG, X. B.; HOU, Y. X.; RIORDAN, J. R. ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 49, p. 30962–30968, 1997.

CHATKON, A. et al. Counterion affects interaction with interfaces: The antidiabetic drugs metformin and decavanadate. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 10–11, p. 1859–1868, 2013.

CHEN, H.-J. et al. Taxifolin Resensitizes Multidrug Resistance Cancer Cells via Uncompetitive Inhibition of P-Glycoprotein Function. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3055, 2018.

CHUFAN, E. E.; SIM, H. M.; AMBUDKAR, S. V. **Molecular Basis of the Polyspecificity of P-Glycoprotein (ABCB1): Recent Biochemical and Structural Studies**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 125

CIANFRIGLIA, M. Targeting MDR1-P-glycoprotein (MDR1-Pgp) in immunochemotherapy of acute myeloid leukemia (AML). v. 49, n. 2, p. 190–208, 2013.

COGDELL, R. J. et al. The use and misuse of photosynthesis in the quest for novel methods to harness solar energy to make fuel. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 371, n. 1996, 2013.

CUI, Q. et al. Glesatinib, a c-MET/SMO Dual Inhibitor, Antagonizes P-glycoprotein Mediated Multidrug Resistance in Cancer Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. April, p. 1–9, 2019.

DA SILVA, J. A. L.; FRAÚSTO DA SILVA, J. J. R.; POMBEIRO, A. J. L. Amavadin, a vanadium natural complex: Its role and applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 15–16, p. 2388–2400, 2013.

DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The Human ATP-Binding Cassette transporter superfamily. **Journal of Lipid Research**, v. 42, p. 1007–1017, 2001.

DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). **FEBS Letters**, v. 580, n. 4, p. 1103–1111, 2006.

DEGORTER, M. K. et al. Molecular modeling of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 365, n. 1, p. 29–34, 2008.

DEWANJEE, S. et al. Natural Products as Alternative Choices for P-Glycoprotein (P-gp) Inhibition. **Molecules**, v. 22, p. 1–93, 2017.

DOYLE, L. A. et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells (mitoxantrone-anthracycline-transporter proteins). **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, n. 26, p. 15665–15670, 1998.

ECKFORD, P. D. W.; SHAROM, F. J. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 2989–3011, 2009.

EFFERTH, T.; VOLM, M. Multiple resistance to carcinogens and xenobiotics: P-glycoproteins as universal detoxifiers. **Archives of Toxicology**, v. 0, n. 0, p. 0, 2017.

EIDE, C. A.; DRUKER, B. J. Understanding cancer from the stem cells up. **Nature Medicine**, v. 23, n. 6, p. 656–657, 2017.

EL MOLL, H. et al. Lanthanide polyoxocationic complexes: Experimental and theoretical stability studies and Lewis acid catalysis. **Chemistry - A European Journal**, v. 17, n. 50, p. 14129–14138, 2011.

ESSER, L. et al. Structures of the Multidrug Transporter P-glycoprotein Reveal Asymmetric ATP Binding and the Mechanism of Polyspecificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 2, p. 446–461, 2017.

EVANGELOU, A. M. Vanadium in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 3, p. 249–265, 2002.

EYTAN, G. D. et al. Efficiency of P-glycoprotein-mediated exclusion of rhodamine dyes from multidrug-resistant cells is determined by their passive transmembrane movement rate. **European Journal of Biochemistry**, v. 248, n. 1, p. 104–112, 1997.

FORD, R. C.; BEIS, K. Learning the ABCs one at a time: structure and mechanism of ABC transporters. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 1, p. 23–36, 2019.

FORSTER, S. et al. Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in in vitro drug transport assays. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

FUKUDA, Y.; SCHUETZ, J. D. ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 8, p. 1073–1083, 2012.

GALANI, A. et al. Two novel compounds of vanadium and molybdenum with carnitine exhibiting potential pharmacological use. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 142, p. 109–117, 2015.

GALIMBERTI, S. et al. Evaluation of BCRP and MDR-1 co-expression by quantitative molecular assessment in AML patients. **Leukemia Research**, v. 28, n. 4, p. 367–372, 2004.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.

GALLUZZI, L.; VITALE, I. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. p. 486–541, 2018.

GRANT, G. A. The many faces of partial inhibition: Revealing imposters with graphical analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 653, n. June, p. 10–23, 2018.

HEGEDUS, T. et al. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1587, n. 2–3, p. 318–325, 2002.

HEO, D. S. et al. EVALUATION OF TETRAZOLIUM-BASED SEMIAUTOMATIC COLORIMETRIC ASSAY FOR MEASUREMENT OF HUMAN ANTITUMOR CYTOTOXICITY. **Cancer Research**, v. 50, n. 12, p. 3681–3690, 1990.

HIGGINS, C. F.; LINTON, K. J. The ATP switch model for ABC transporters. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 11, n. 10, p. 918–926, 2004.

HORSEY, A. J. et al. The multidrug transporter ABCG2: still more questions than answers. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 3, p. 824–830, 2016.

HU, Y. et al. Vanadium nitrogenase : A two-hit wonder ? **Dalton Transactions**, v. 41, p. 1118–1127, 2012.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-p, resistência a múltiplas drogas (mdr) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148–2154, 2010.

JD. ALLEN et al. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. **Molecular cancer therapeutics**, v. 1, n. 6, p. 417–425, 2002.

JIANG, W. et al. Sodium orthovanadate overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting Na⁺/K⁺-ATPase activity and hypoxia-inducible pathways. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

JOHNSON, Z. L.; CHEN, J. Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 1075–1085.e9, 2017.

JONES, P. M.; GEORGE, A. M. Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modelling. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 5, p. 555–566, 2005.

JULIANO, R. .; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug in chinese hamster ovary cell mutants permeability. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 455, p. 152–162, 1976.

KARBOWNIK, A. et al. The influence of the coadministration of the p-glycoprotein modulator elacridar on the pharmacokinetics of lapatinib and its distribution in the brain and cerebrospinal fluid. **Investigational New Drugs**, 2019.

KATHAWALA, R. J. et al. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. **Drug Resistance Updates**, v. 18, p. 1–17, 2015.

KIM, T. H. et al. Effects of phytochemical P-glycoprotein modulators on the pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin in mice. **Molecules**, v. 23, n. 2, 2018.

KIMCHI-SARFATY, C. et al. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. **Science**, v. 315, n. 5811, p. 525–528, 2007.

KRAPF, M. K. et al. 2,4,6-Substituted Quinazolines with Extraordinary Inhibitory Potency toward ABCG2. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 17, p. 7952–7976, 2018.

LANCET, J. E. et al. A phase I trial of continuous infusion of the multidrug resistance inhibitor zosuquidar with daunorubicin and cytarabine in acute myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 33, n. 8, p. 1055–1061, 2009.

LEE, S. Y. et al. Polyoxometalates - Potent and selective ecto-nucleotidase inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v. 93, n. 2, p. 171–181, 2015.

LEÓN, I. E. et al. Metvan, bis(4,7-Dimethyl-1,10-phenanthroline)sulfatooxidovanadium(IV): DFT and Spectroscopic Study—Antitumor Action on Human Bone and Colorectal Cancer Cell Lines. **Biological Trace Element Research**, n. lv, 2018.

LEOPOLDO, M. et al. An updated patent review on P-glycoprotein inhibitors (2011-2018). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 29, n. 6, p. 455–461, 2019.

LIAO, M. et al. Preclinical absorption, distribution, metabolism, excretion and pharmacokinetics of a novel selective inhibitor of breast cancer resistance protein (BCRP). **Xenobiotica**, v. 48, n. 5, p. 467–477, 2018.

LIVAGE, J. Hydrothermal synthesis of nanostructured vanadium oxides. **Materials**, v. 3, n. 8, p. 4175–4195, 2010.

LUGO, M. R.; SHAROM, F. J. Kinetic validation of the models for P-glycoprotein ATP hydrolysis and vanadate-induced trapping. Proposal for additional steps. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

MARKMAN, J. L. et al. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13–14, p. 1866–1879, 2013.

MARTINEZ, L. et al. Understanding polyspecificity within the substrate-binding cavity of the human multidrug resistance P-glycoprotein. **FEBS Journal**, v. 281, n. 3, p. 673–682, 2014.

MAURYA, M. R. et al. Synthesis, characterisation, reactivity and in vitro antiamebic activity of hydrazone based oxovanadium(IV), oxovanadium(V) and -bis(oxo) bis{oxovanadium(V)} complexes. **Dalton Transactions**, n. 7, p. 937–947, 2006.

MEGÍAS-VERICAT, J. E. et al. Salvage regimens using conventional chemotherapy agents for relapsed/refractory adult AML patients: a systematic literature review. **Annals of Hematology**, v. 97, n. 7, p. 1115–1153, 2018.

MISSINA, J. M. et al. Effects of Decavanadate Salts with Organic and Inorganic Cations on Escherichia coli, Giardia intestinalis, and Vero Cells. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 11930–11941, 2018.

MOHAMMAD, A.-A. et al. Effect of sodium metavanadate supplementation on lipid and glucose metabolism biomarkers in type 2 diabetic patients. **Malaysian journal of nutrition**, v. 14, n. 1, p. 113–9, 2008.

MONAKHOV, K. Y.; BENSCH, W.; KÖGERLER, P. Semimetal-functionalised polyoxovanadates. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 23, p. 8443–8483, 2015.

NANAYAKKARA, A. K. et al. Targeted inhibitors of P-glycoprotein increase chemotherapeutic-induced mortality of multidrug resistant tumor cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2018.

NICKLISCH, S. C. T. et al. Global marine pollutants inhibit P-glycoprotein: Environmental levels, inhibitory effects, and cocrystal structure. **Sci. Adv.** v. 2 n. 16 April, 2016.

OOMS, K. J. et al. 51V Solid-state NMR and Density-Functional Theory Studies of Eight-Coordinate Non-Oxo Vanadium Complexes: Oxidized Amavadin. **Dalton Transactions**, v. 17, n. 17, p. 3262–3269, 2014.

PATEL, A. et al. Suppression of ABCG2 mediated MDR in vitro and in vivo by a novel inhibitor of ABCG2 drug transport. **Pharmacological Research**, v. 121, p. 184–193, 2017.

PATERNA, A. et al. Monoterpene indole alkaloid azine derivatives as MDR reversal agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 421–434, 2018.

PESSOA, J. C. Thirty years through vanadium chemistry. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 147, p. 4–24, 2015.

PETERS, K. G. et al. Mechanism of insulin sensitization by BMOV (bis maltolato oxo vanadium); Unliganded vanadium (VO_4) as the active component. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 96, n. 2–3, p. 321–330, 2003.

PEZZA, R. J. et al. Vanadate inhibits the ATPase activity and DNA binding capability of bacterial MutS. A structural model for the vanadate-MutS interaction at the Walker A motif. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 21, p. 4700–8, 2002.

POSTAL, K. et al. Chemoprotective activity of mixed valence polyoxovanadates against diethylsulphate in *E. coli* cultures: insights from solution speciation studies. **RSC Advances**, v. 6, n. 115, p. 114955–114968, 2016.

QI, W. et al. The anti-proliferation activity and mechanism of action of $K_{12}[V_{18}O_{42}(H_2O)] \cdot 6H_2O$ on breast cancer cell lines. **Molecules**, v. 22, n. 9, 2017.

QIU, Q. et al. Exploration of 2-((Pyridin-4-ylmethyl)amino)nicotinamide Derivatives as Potent Reversal Agents against P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 2930–2943, 2017.

RAMOS, S.; MOURA, J. J. G.; AURELIANO, M. A comparison between vanadyl, vanadate and decavanadate effects in actin structure and function: Combination of several spectroscopic studies. **Advances in Biomedical Spectroscopy**, v. 7, n. 5, p. 261–265, 2013.

RAO, D. K. et al. A Combination of Curcumin with Either Gramicidin or Ouabain Selectively Kills Cells That Express the Multidrug. **The journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 45, p. 31397–31410, 2014.

REES, J. A. et al. The Fe-V Cofactor of Vanadium Nitrogenase Contains an Interstitial Carbon Atom. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 45, p. 13249–13252, 2015.

REHDER, D. The future of/for vanadium. **RSC Publishing**, n. 1, p. 11749–11761, 2013.

REHDER, D. Vanadium in health issues. **ChemTexts**, v. 4, n. 4, p. 0, 2018.

ROBEY, R. W. et al. A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2). **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1512, n. 2, p. 171–182, 2001.

ROBEY, R. W. et al. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 10, p. 1971–1978, 2003.

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

ROSENBERG, M. F. et al. Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. **the EMBO Journal**, v. 20, n. 20, p. 5615–5625, 2001.

SAENGKHAE, C.; LOETCHUTINAT, C.; GARNIER-SUILLEROT, A. Kinetic Analysis of Rhodamines Efflux Mediated by the Multidrug Resistance Protein (MRP1). **Biophysical Journal**, v. 85, n. 3, p. 2006–2014, 2014.

SAJID, A. et al. Evidence for the critical role of transmembrane helices 1 and 7 in substrate transport by human P-glycoprotein (ABCB1). **PLoS ONE**, v 13, p. 1–21, 2018.

SAMART, N. et al. Decavanadate Inhibits Mycobacterial Growth More Potently Than Other Oxovanadates. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. November, p. 1–16, 2018.

SÁNCHEZ-LARA, E. et al. Decavanadate Salts of Cytosine and Metformin: A Combined Experimental-Theoretical Study of Potential Metallodrugs Against Diabetes and Cancer. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. October, p. 1–18, 2018.

SANNA, D. et al. Speciation in human blood of Metvan, a vanadium based potential anti-tumor drug. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 28, p. 8950–8967, 2017.

SHAROM, F. J. The P-glycoprotein multidrug transporter. **General Pharmacology**, v. 27, n. 8, p. 1283–1291, 2011.

SILVA, R. et al. Pharmacology & Therapeutics Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 149, p. 1–123, 2015.

SIPPEL, D.; EINSLE, O. The structure of vanadium nitrogenase reveals an unusual bridging ligand. **Europe PMC Funders Group**. v. 13, n. 9, p. 956–960, 2018.

STEFAN, S. M.; WIESE, M. Small-molecule inhibitors of multidrug resistance-associated protein 1 and related processes: A historic approach and recent advances. **Medicinal Research Reviews** v. 39, n. April 2018, p. 176–264, 2019.

STEINBICHLER, T. B. et al. Therapy resistance mediated by exosomes. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2019.

SUBRAMANIAN, N. et al. Probing the Pharmacological Binding Sites of P-Glycoprotein Using Umbrella Sampling Simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 5, p. 2287–2298, 2019.

SZAKÁCS, G. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 219–234, 2006.

SZAKÁCS, G. et al. Targeting the achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 11, p. 5753–5774, 2014.

TAMAKI, A. et al. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. **Essays In Biochemistry**, v. 50, p. 209–232, 2011.

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

THOMPSON, K. H. et al. Vanadium treatment of type 2 diabetes : A view to the future. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 554–558, 2009.

TREVIÑO, S. et al. Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus. **Biological Trace Element Research**, v. 188, n. 1, p. 68–98, 2019.

TURNER, T. L. et al. Inhibitory effects of decavanadate on several enzymes and *Leishmania tarentolae* in Vitro. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 108, p. 96–104, 2012.

WANG, C. et al. Nicotinamide Administration Improves Remyelination after Stroke. **Neural Plasticity**, v. 2017, 2017.

WANG, E. J. et al. Cooperativity in the inhibition of P-Glycoprotein-mediated daunorubicin transport: Evidence for half-of-the-sites reactivity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 383, n. 1, p. 91–98, 2000.

WILKENS, S. Structure and mechanism of ABC transporters. **F1000 Prime Reports**, v. 9, n. February, p. 1–9, 2015.

ZHAI, F. et al. Synthesis and biological evaluation of decavanadate $\text{Na}_4\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6\text{V}_{10}\text{O}_{28} \cdot 18\text{H}_2\text{O}$. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 63, n. 1, p. 51–55, 2009.