

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISADORA DA SILVA ZANZARINI

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE CARBAZOLES
COMO NOVOS INIBIDORES DO TRANSPORTADOR ABCG2

CURITIBA

2019

ISADORA DA SILVA ZANZARINI

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE CARBAZOLES
COMO NOVOS INIBIDORES DO TRANSPORTADOR ABCG2

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

Orientador: Prof. Dr. Glaucio Valdameri

Coorientadora: Profa. Dra. Vivian Rotuno
Moure Valdameri

Coorientador: Prof. Dr. Marc Le Borgne

CURITIBA

2019

Zanzarini, Isadora da Silva

Identificação e caracterização de derivados de carbazoles como novos inibidores do transportador ABCG2 [recurso eletrônico] / Isadora da Silva Zanzarini – 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. Vivian Rotuno Moure Valdameri

Coorientador: Professor Dr. Marc Le Borgne

1. Resistência à múltiplas drogas. 2. Transportadores ABC, ABCG2.
3. Inibidores. 4. Carbazoles. I. Valdameri, Glaucio. II. Valdameri, Vivian Rotuno Moure. III. Le Borgne, Marc. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.1901



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ISADORA DA SILVA ZANZARINI** intitulada: **IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE CARBAZOLES COMO NOVOS INIBIDORES DO TRANSPORTADOR ABCG2**, 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, 29 de Março de 2019.

GLÁUCIO VALDAMERI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA

Avaliador Externo (FIOCRUZ)

GERALDO PICHETH

Avaliador Interno (UFPR)

Dedico este trabalho a todos que me acompanharam ao longo desta incrível jornada, especialmente minha família e meu namorado Gustavo, os quais muitas vezes acreditaram em mim mais do que eu mesma. Que esta conquista possa honrar todo o apoio e amor recebidos.

“Gostaria que você soubesse que existe dentro de si uma força capaz de mudar sua vida, basta que lute e aguarde um novo amanhecer.”

Margaret Thatcher

RESUMO

O câncer é uma das doenças de maior índice mundial de mortalidade e o surgimento de neoplasias resistentes à quimioterapia convencional agrava ainda mais este problema. São descritos diversos mecanismos relacionados à resistência à múltiplas drogas (MDR), porém a superexpressão de transportadores ABC é considerada a principal causa deste preocupante quadro clínico. O genoma humano codifica 48 transportadores ABC, dentre os quais 3 destacam-se quanto aos seus respectivos envolvimento no processo de MDR: Glicoproteína-P (P-gp), *multidrug resistance associated protein-1* (MRP1) e *breast cancer resistance protein* (BCRP ou ABCG2). Estes três transportadores são capazes de reconhecer um amplo espectro de quimioterápicos e promover seu efluxo e, por esta razão, novos agentes vêm sendo estudados com o intuito de inibir o transporte mediado por estas proteínas. Apesar de ser um dos três transportadores ABC com maiores índices de envolvimento na MDR, o ABCG2 ainda não possui inibidores promissores o suficiente para serem direcionados às etapas clínicas do desenvolvimento de novos fármacos, tornando-se relevante a identificação e caracterização de novas moléculas que possam atuar como inibidores seletivos desta proteína. Neste contexto, foram testados 5 derivados de carbazoles – BAB67, BAB72, BAB74, BAB75 e BAB77 – quanto à capacidade de inibir o transportador ABCG2, os quais apresentaram capacidade inibitória frente ao transportador (valores de IC_{50} de 1,55; 3,39; 0,80; 0,49 e 0,60 μ M, respectivamente) e mostraram-se altamente seletivos para ABCG2 quando testados frente aos transportadores P-gp e MRP1. Além disso, foi demonstrado que os 5 compostos não são citotóxicos, apresentando valores de IG_{50} de citotoxicidade superiores a 100 μ M. Considerando a razão terapêutica (RT) (citotoxicidade/inibição), identificamos o composto BAB75 como o mais promissor da série testada, com uma RT superior a 200. Foi demonstrado que o BAB75 foi capaz de inibir o efluxo de diferentes substratos e reverter o fenótipo de resistência mediado pelo transportador ABCG2. No que diz respeito ao mecanismo de inibição, foi demonstrado que o BAB75 apresentou uma inibição do tipo não competitiva, não apresenta efeitos no reconhecimento do anticorpo conformacional 5D3 pelo transportador ABCG2 tampouco sobre a atividade ATPase da referida proteína. Por fim foi identificado por *docking* que o resíduo de fenilalanina 439 ligado aos anéis fusionados do BAB75 está majoritariamente envolvido com a ligação do composto na região transmembrana de ABCG2, ressaltando a importância do arcabouço hidrofóbico da molécula para que haja interação entre transportador e inibidor. Este conjunto de resultados demonstra que os derivados de carbazoles testados no presente estudo são promissores inibidores seletivos de ABCG2, capazes de reverter a resistência mediada pelo transportador em ensaios de longa duração e apresentam mínima citotoxicidade, características que possibilitam futuros ensaios pré-clínicos.

Palavras-chave: resistência à múltiplas drogas (MDR), transportadores ABC, ABCG2, inibidores, carbazoles.

ABSTRACT

Cancer is one of the diseases with the highest mortality rate in the world and the emergence of neoplasms resistant to conventional chemotherapy exacerbates this problem. Several mechanisms related to multidrug resistance (MDR) have been described, however the overexpression of ABC transporters is considered the main cause of this worrying clinical condition. The human genome encodes 48 ABC transporters, among which 3 are highlighted for their involvements in the MDR phenomenon: P-glycoprotein, multidrug resistance associated protein-1 (MRP1) and breast cancer resistance protein (BCRP or ABCG2). These three transporters can recognize a broad spectrum of antineoplastic agents and promote their efflux; therefore, new compounds have been studied to inhibit the transport mediated by these proteins. Although ABCG2 is one of the three ABC transporters with the highest involvement in MDR, there are still no promising inhibitors to be forwarded to clinical steps of drug development, which makes the identification and characterization of new selective inhibitors of this protein very important. In this context, 5 carbazoles derivatives – BAB67, BAB72, BAB74, BAB75 e BAB77 – had their ability to inhibit the ABCG2 transporter tested and all compounds were capable to inhibit the protein (IC_{50} values of 1,55; 3,39; 0,80; 0,49 and 0,60 μ M, respectively) and were highly selective for ABCG2 when tested against the P-gp and MRP1 transporters. In addition, the 5 compounds have been shown to be non-cytotoxic, showing IG_{50} values of cytotoxicity higher than 100 μ M. Considering the therapeutic ratio (TR) (cytotoxicity / inhibition), we identified BAB75 as the most promising compound, with an TR higher than 200. BAB75 has been shown to inhibit the efflux of different substrates and to reverse the resistance phenotype mediated by the ABCG2 transporter. As for its inhibition mechanism, BAB75 has been shown to make a noncompetitive inhibition, showing no effects neither on recognizing the 5D3 conformational antibody by ABCG2 nor on the ATPase activity of the protein. Finally, it was identified by molecular docking that the bound between phenylalanine residue 439 and the fused rings of BAB75 is mostly involved with the interaction of the compound in the transmembrane region of ABCG2, emphasizing the importance its hydrophobic core. These results demonstrate that the carbazoles derivatives tested in this study are promising as selective inhibitors of ABCG2, can reverse de resistance mediated by ABCG2 in long-term trials and show minimal cytotoxicity, characteristics that enable future preclinical trials.

Keywords: multidrug resistance (MDR), ABC transporters, ABCG2, inhibitors, carbazoles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA	15
FIGURA 2 - FATORES CELULARES CAPAZES DE CAUSAR RESISTÊNCIA À DROGAS.....	17
FIGURA 3 - ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS EM ALTA RESOLUÇÃO DOS TRANSPORTADORES ABCG2, P-GP E MRP1	19
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO COMPLETO DE EFLUXO DE SUBSTRATOS.....	20
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DAS MUDANÇAS CONFORMACIONAIS DURANTE O PROCESSO DE EFLUXO.....	21
FIGURA 6 - ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DO TRANSPORTADOR P-GP	25
FIGURA 7 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO TRANSPORTADOR MRP1	27
FIGURA 8 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO TRANSPORTADOR ABCG2	31
FIGURA 9 - RECENTES ELUCIDAÇÕES ESTRUTURAIS ACERCA DO TRANSPORTADOR ABCG2.....	40
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DE SUPERFÍCIE DO TRANSPORTADOR ABCG2 E SUAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES LIPÍDICAS	41
FIGURA 11 - POSSIBILIDADES DE OCUPAÇÃO DA CAVIDADE 1 E CONSEQUENTE IMPEDIMENTO DO APORTE DE SUBSTRATOS DE ABCG2	42
FIGURA 12 - POSSIBILIDADES DE INTERAÇÃO ENTRE ABCG2 E SEUS INIBIDORES.....	43
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA FTALAZINA.....	46
FIGURA 14 - DERIVADOS DE CARBAZOLES AVALIADOS NO PRESENTE ESTUDO	58
FIGURA 15 - FLUXOGRAMA DE TRABALHO	62

FIGURA 16 - INIBIÇÃO DO EFLUXO DE MITOXANTRONA MEDIADO PELO TRANSPORTADOR ABCG2 REALIZADO PELOS DERIVADOS DE CARBAZOLES EM ESTUDO	64
FIGURA 17 - AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES EM ESTUDO PARA INIBIR O TRANSPORTADOR ABCG2...	66
FIGURA 18 - AFINIDADE E CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES FRENTE AO TRANSPORTADOR ABCG2	70
FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DO BAB75 FRENTE AO TRANSPORTADOR ABCG2 UTILIZANDO HOECHST 33342 COMO SUBSTRATO	77
FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR ABCG2 PROMOVIDO PELO BAB75.....	80
FIGURA 21 - ISOMERIA ESPACIAL DO BAB75	81
FIGURA 22 - DOCKING MOLECULAR DO BAB75 NO TRANSPORTADOR ABCG2	83
FIGURA 23 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BAB75 NA REVERSÃO DA RESISTÊNCIA REALIZADA PELO TRANSPORTADOR ABCG2.....	85

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	TUMORES MULTI RESISTENTES: UM DOS FENÔMENOS MAIS DESAFIADORES À QUIMIOTERAPIA ATUAL	15
2.2	TRANSPORTADORES ABC (<i>ATP-BINDING CASSETTE</i>).....	17
2.2.1.	Aspectos estruturais e funcionamento dos transportadores ABC ...	18
2.2.2.	Atividade biológica dos transportadores ABC	22
2.2.3.	P-gp.....	24
2.2.4.	MRP1	26
2.2.5.	ABCG2	28
2.2.6.	Uso de inibidores em transportadores ABC	31
2.2.6.1.	Uso de Inibidores no transportador ABCB1 (P-gp).....	33
2.2.6.2.	Uso de inibidores no transportador ABCC1 (MRP1)	35
2.2.6.3.	Uso de inibidores do transportador ABCG2 (BCRP)	36
2.3	CARBAZOLES	44
3.	OBJETIVOS	49
3.1	OBJETIVO GERAL.....	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1	DERIVADOS DE CARBAZOLES UTILIZADOS	50
4.2	SOLUÇÕES	50
4.3	LINHAGENS CELULARES	50
4.4	IDENTIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE INIBIDORES DOS TRANSPORTADORES ABC (ABCG2, P-gp e MRP1).....	53
4.5	AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO E EFEITO SOBRE A REVERSÃO DA RESISTÊNCIA MEDIADA PELO	

	TRANSPORTADOR ABCG2 ATRAVÉS DE ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	53
4.6	ENSAIO DE LAVAGEM.....	54
4.7	MICROSCOPIA CONFOCAL	55
4.8	MÉTODOS COMPUTACIONAIS.....	55
4.9	MEDIDA DA ATIVIDADE ATPASE DO TRANSPORTADOR ABCG2	56
4.10	USO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 5D3	57
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1	AVALIAÇÃO DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES COMO INIBIDORES DO TRANSPORTADOR ABCG2.....	63
5.2	AVALIAÇÃO DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES EM ESTUDO COMO INIBIDORES SELETIVOS DO TRANSPORTADOR ABCG2	65
5.3	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR ABCG2 (IC_{50}) E CITOTOXICIDADE (IG_{50}) DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES EM ESTUDO	68
5.4	RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES EM ESTUDO COMO INIBIDORES DE ABCG2	73
5.5	CONFIRMAÇÃO DA INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR ABCG2 UTILIZANDO SUBSTRATO ALTERNATIVO	75
5.6	CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DO BAB75 FRENTE AO TRANSPORTADOR ABCG2	77
5.7	IDENTIFICAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DO BAB75 NO TRANSPORTADOR ABCG2.....	81
5.8	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BAB75 NA REVERSÃO DA RESISTÊNCIA MEDIADA PEO TRANSPORTADOR ABCG2	84
6.	CONCLUSÕES	87
7.	PERSPECTIVAS	88
	REFERÊNCIAS	89

ANEXO 1 – PERCENTUAL DE INIBIÇÃO: FUNDAMENTOS ANALÍTICOS E MEMORIAL DE CÁLCULOS	96
--	----

1. INTRODUÇÃO

O fenômeno de resistência à múltiplas drogas (MDR) representa um dos maiores desafios à clínica oncológica atual. A resistência exercida por células neoplásicas aos quimioterápicos presentes nos protocolos terapêuticos pode ser atribuída a diversos fatores biológicos, contudo, a superexpressão de transportadores ABC, representados majoritariamente por proteínas transmembrana que atuam como bombas de efluxo ATP-dependentes, representa a principal causa da promoção do fenótipo de MDR e consequente ineficiência dos regimes antineoplásicos vigentes (ROBEY et al., 2018).

Nas últimas décadas, grandes esforços têm sido investidos na identificação de inibidores dos três principais transportadores ABC relacionados diretamente ao fenômeno de MDR (glicoproteína P – P-gp – codificada pelo gene *ABCB1*; *multidrug resistance associated protein-1* – MRP1 – codificada pelo gene *ABCC1*; *breast cancer resistance protein* – BCRP ou ABCG2 – codificada pelo gene *ABCG2*). Dentre os três, o transportador ABCG2 foi o mais recentemente descoberto e, por esta razão, seu processo de desenvolvimento e caracterização de inibidores específicos encontra-se em situação menos avançada. Sua recente elucidação estrutural em alta resolução permitirá um delineamento mais acurado e possivelmente mais assertivo para identificação de novos inibidores específicos (JOHNSON; CHEN, 2017; TAYLOR et al., 2017).

Neste estudo foram identificados derivados de carbazoles como novos inibidores do transportador ABCG2 com características que viabilizam futuros estudos pré-clínicos. A seletividade e citotoxicidade dos derivados de carbazoles foi avaliada. O inibidor mais promissor foi submetido a uma análise de caracterização do mecanismo de inibição do transportador ABCG2 através de ensaios baseados em célula e *in silico*. Por fim, foi realizada a avaliação de sua utilidade clínica através da realização de ensaios de longa duração para verificação de sua capacidade de reverter o fenótipo de resistência mediado por ABCG2.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TUMORES MULTI RESISTENTES: UM DOS FENÔMENOS MAIS DESAFIADORES À QUIMIOTERAPIA ATUAL

Considerando as doenças com maiores índices mundiais de mortalidade, o câncer ocupa posição consideravelmente destacada. No Brasil, dados fornecidos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimaram o surgimento de mais de 630.000 novos casos da doença para o ano de 2018 (Fig. 1). Os diversos tipos de câncer distribuem-se segundo índices de prevalência e incidência que variam de acordo com o sexo. Na população masculina, o tipo de câncer mais incidente é o câncer de próstata (31,7%), seguido pelo de traqueia, brônquio e pulmão (8,7%) e cólon e reto (8,1%). Já na população feminina, o tipo de câncer mais incidente é o de mama (29,5%), seguido pelo de cólon e reto (9,4%) e colo do útero (8,1%) (INCA, 2018).

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA

Localização Primária	Casos	%		Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%	Homens	Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%	Mulheres	Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%		Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%		Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%		Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%		Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%		Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%		Leucemias	4.860	2,4%

FONTE: Adaptado (INCA, 2018).

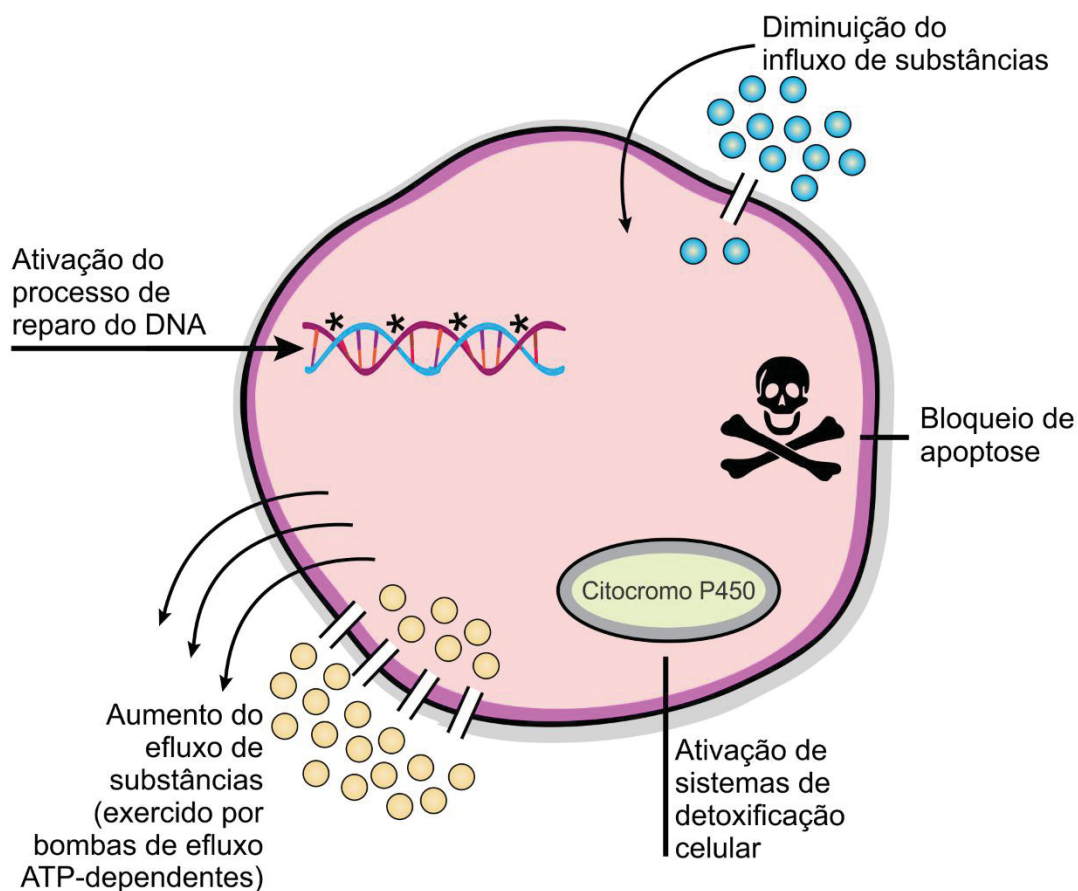
NOTA: Números arredondados para múltiplos de 10.

Um dos maiores desafios enfrentados na terapêutica aplicada aos vários tipos de câncer é a resistência ao tratamento quimioterápico. O quadro clínico de resistência está relacionado a inúmeros fatores (Fig.2), como a captação reduzida ou sequestro de drogas, alteração nas enzimas-alvo, alteração do metabolismo da droga, aumento no reparo do DNA, falha dos mecanismos regulatórios de morte celular programada e efluxo do quimioterápico mediado por transportadores ABC (SZAKACS et al., 2006).

O transporte de quimioterápicos realizado por transportadores ABC contribui para o surgimento do fenômeno de resistência à múltiplas drogas (MDR – *multidrug resistance*), uma vez que esses transportadores são capazes de transportar moléculas sem correlação estrutural, ou seja, a resistência adquirida a um quimioterápico transcende para outros quimioterápicos de classes químicas diferentes (SZAKACS et al., 2006; SZAKÁCS et al., 2014). Estudos recentes sugerem que a expressão destes transportadores efetuam um importante papel em determinados quadros clínicos de MDR e consideram-na atualmente o principal mecanismo de resistência ao tratamento do câncer (ROBEY et al., 2018).

Tratamentos à base de drogas antitumorais podem também resultar em quadros clínicos de MDR devido ao estímulo do aparecimento de células menos susceptíveis ao próprio regime terapêutico (SZAKÁCS et al., 2014). Tal situação se dá devido ao desenvolvimento e acionamento de mecanismos bioquímicos capazes de interferir na atividade destas drogas, resultando em células tumorais com suas respectivas sensibilidades iniciais ao tratamento diminuídas ou até mesmo completamente anuladas (BORST, 2012).

FIGURA 2 - FATORES CELULARES CAPAZES DE CAUSAR RESISTÊNCIA À DROGAS



FONTE: O Autor (2019).

NOTA: Considerando os vários mecanismos envolvidos no processo de MDR, destacam-se o aumento de efluxo de drogas quimioterápicas realizado por bombas de efluxo como os transportadores ABC, redução do influxo de drogas que costumam penetrar na célula através de carreadores intracelulares ou endocitose, ativação de proteínas detoxificantes (oxidases do citocromo P450, à exemplo) em casos onde o acúmulo intracelular da droga permanece inalterado, ativação de mecanismos de reparo de danos induzidos por drogas no DNA, além do bloqueio de cascatas de sinalização apoptótica, tornando a célula resistente à morte celular induzida por drogas.

2.2 TRANSPORTADORES ABC (*ATP-BINDING CASSETTE*)

Os transportadores pertencentes à família ABC são proteínas que, em sua extensa maioria, translocam substâncias através das membranas celulares, sendo este processo dependente de energia (ligação e hidrólise de moléculas de ATP). Em bactérias, são responsáveis pela captação de substâncias do meio extracelular para o intracelular. De maneira oposta, em

mamíferos, os mesmos são responsáveis exclusivamente pelo efluxo de substâncias (HIGGINS, 1992).

O grupo ABC corresponde a uma grande família de proteínas, com mais de 2.000 exemplares identificados (DASSA; BOUIGE, 2001). Estas proteínas foram descobertas primeiramente em bactérias, na década de 1950, porém atualmente sabe-se que estes transportadores são encontrados em diferentes organismos pertencentes aos três domínios taxonômicos: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya* (LOCHER, 2004). Apesar de nem todos os membros desta grande família de proteínas estarem relacionados ao transporte de moléculas, a maior parte delas apresenta como principal função o transporte unidirecional de substratos, através de membranas biológicas. (SAURIN et al., 1999).

Foram identificados 48 genes da família de transportadores ABC no genoma humano e, dentre estes, aproximadamente 19 são bem descritos como transportadores envolvidos no transporte de quimioterápicos em sistemas *in vitro* (ALLIKMETS; DEAN; RZHETSKY, 2001; SZAKACS et al., 2006). Destes, destacam-se os 3 principais transportadores ABC envolvidos diretamente no processo de MDR e, portanto, clinicamente relevantes, uma vez que encontram-se superexpressos em diversos tipos de neoplasias resultando em um mau prognóstico em pacientes acometidos pela doença (SCHINKEL; JONKER, 2012). Os três transportadores destacados anteriormente são a glicoproteína-P (Pgp ou MDR1, codificada pelo gene *ABCB1*), a *multidrug resistance associated protein-1* (MRP1, codificada pelo gene *ABCC1*) e a *breast cancer resistance protein* (BCRP, codificada pelo gene *ABCG2*) (ZAHREDDINE et al., 2013).

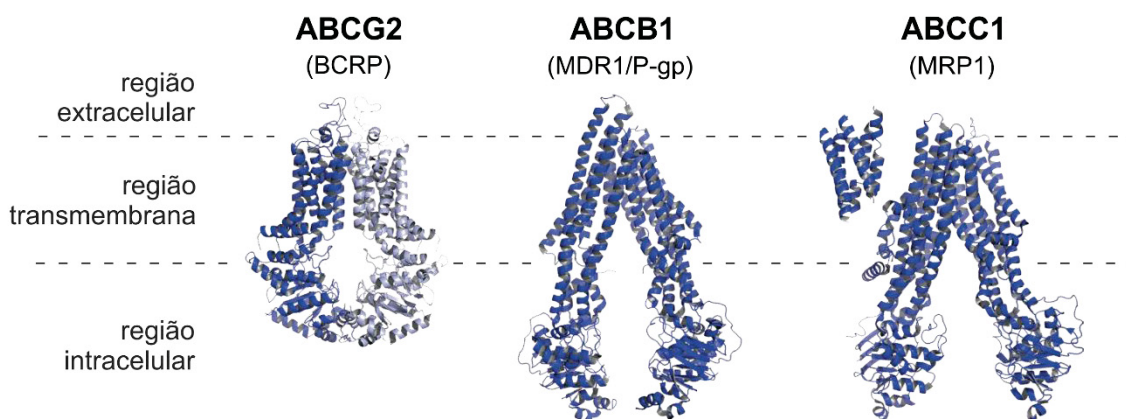
2.2.1. Aspectos estruturais e funcionamento dos transportadores ABC

Os transportadores ABC, presentes em todos os reinos biológicos, conduzem essenciais reações de transporte de substratos através de membranas celulares. A unidade funcional mínima de todos os transportadores ABC compreende dois domínios transmembrana (conhecidos como TMDs – *Transmembrane Domains*), sendo cada um composto por 6 α -hélices hidrofóbicas que participam no reconhecimento e transporte de substratos, e

dois domínios – citoplasmáticos – ligantes de nucleotídeo (conhecidos como NBDs – *Nucleotide Binding Domains*) onde ocorre a ligação e hidrólise de moléculas de ATP, conferindo a energia necessária para a realização do transporte de substâncias (SZÖLLŐSI et al., 2018).

Estruturalmente, os chamados transportadores completos (*full transporters*) apresentam os quatro domínios, anteriormente mencionados, expressos como uma única cadeia polipeptídica; tal configuração pode ser observada na arquitetura molecular da P-gp. Alguns membros da família ABC apresentam apenas metade da configuração funcional mínima, possuindo apenas um TMD e um NBD, também expressos como uma única cadeia peptídica, fazendo-se necessária a junção de dois destes polímeros para formar homo ou heterodímeros funcionais. O transportador ABCG2 exemplifica o caso dos transportadores incompletos (*half transporters*) que atingem suas configurações funcionais após sofrerem um processo de dimerização. Uma terceira modalidade estrutural merece menção, encontrada no subtipo ABCC, como o transportador ABCC1 (MRP1), composta por um domínio transmembrana adicional (denominado TMD0), contendo 5 α -hélices e desvinculado da cadeia peptídica principal, e dois domínios nucleotídeos não equivalentes. (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002; SZAKÁCS et al., 2014; SZÖLLŐSI et al., 2018). Os três exemplos estruturais supracitados encontram-se a seguir, na figura 3.

FIGURA 3 - ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS EM ALTA RESOLUÇÃO DOS TRANSPORTADORES ABCG2, P-GP E MRP1

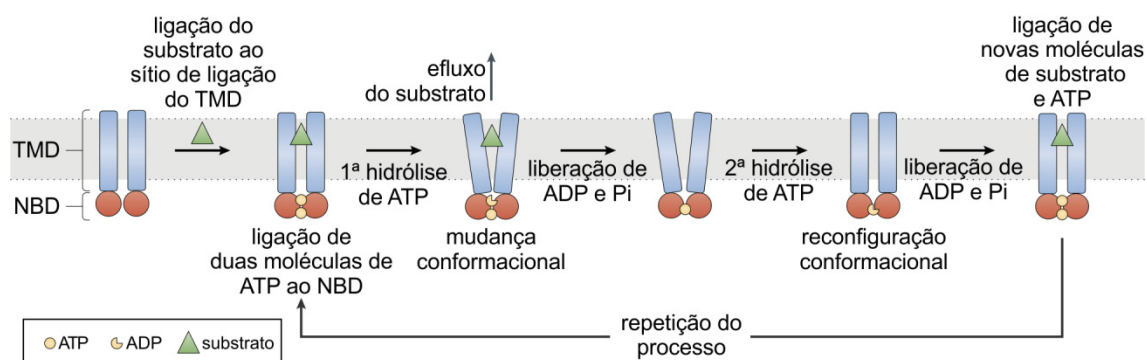


FONTE: Adaptado (ROBEY et al., 2018).

NOTA: ABCG2 (PDB ID 5NJ3), P-gp ou MDR1 (PDB ID 5KPI) e MRP1 (PDB ID 5UJ9).

Em todos os membros da família ABC, os TMDs representam o local de reconhecimento e translocação de substratos e, graças à natureza anfipática desta classe de domínios, posicionam-se parcialmente inseridos na membrana plasmática. Os TMDs sofrem alterações conformacionais para que seja possível a ligação do substrato e sua liberação no meio extracelular. Tais mudanças conformacionais estão intimamente relacionadas (acopladas) à atividade principal dos NBDs, os quais, através da ligação e hidrólise de duas moléculas de ATP, induzem alterações conformacionais nos TMDs e energizam o ciclo de transporte. Os NBDs possuem dois sítios distintos de ligação de nucleotídeo (conhecidos como NBSs – *Nucleotide Binding Sites*), os quais representam as partes mais conservadas entre todos os transportadores ABC (SZÖLLŐSI et al., 2018). Após a ligação do substrato ao sítio de ligação localizado nos TMDs, duas moléculas de ATP ligam-se aos NBSs; a primeira reação de hidrólise de ATP induz a alteração conformacional necessária aos TMDs para que possam liberar o substrato para fora da proteína (em um caso típico, e mais comumente observado, de atividade transportadora via efluxo); a segunda molécula de ATP é hidrolisada para que a proteína recupere sua conformação nativa permitindo que novas moléculas de substrato e ATP possam se ligar aos seus respectivos sítios e, assim, sustentarem o processo (Fig. 4) (ROBEY et al., 2018).

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO COMPLETO DE EFLUXO DE SUBSTRATOS

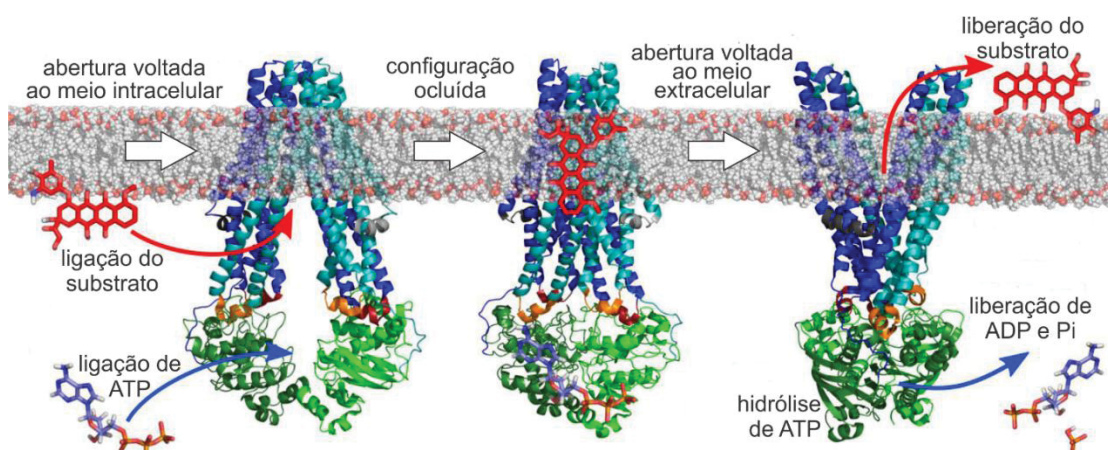


FONTE: Adaptado (ROBEY et al., 2018).

NOTA: A representação esquemática apresentada na figura 4 compreende a atividade de efluxo de substratos realizada pelos principais transportadores ABC relacionados à MDR.

Desta forma, o transportador tem sua configuração nativa, com abertura voltada ao meio intracelular, alterada para um momento conformacional ocluído – também conhecido como conformação “cabeça-cauda”, quando o sítio de ligação de substrato albergado pelos TMDs e os sítios de ligação de moléculas de ATP (NBSs) albergados pelos NBDs encontram-se devidamente preenchidos – e, após a primeira reação de hidrólise de ATP, sofre nova alteração conformacional para efetuar o efluxo do substrato, configurando-se com abertura voltada para o meio extracelular (Fig. 5).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DAS MUDANÇAS CONFORMACIONAIS DURANTE O PROCESSO DE EFLUXO



FONTE: Adaptado (SZÖLLÖSI et al., 2018).

NOTA: A figura representa o processo de efluxo, descrito até o momento da liberação do substrato, com sinalizações otimizadas dos sítios de ligação de moléculas de substrato e ATP, albergados nos TMDs e NBDs, respectivamente. Reprodução melhor elucidada dos momentos conformacionais observados em um transportador ABC ativo a partir da estrutura resolvida da P-gp (ABCB1).

Enquanto a estrutura e função dos NBDs permanecem similares, os TMDs são consideravelmente heterogêneos ao longo da família ABC, permitindo que seus membros reconheçam uma ampla diversidade de substratos. A utilização de energia proveniente da ligação e hidrólise de moléculas de ATP permite que os substratos sejam translocados através da membrana de maneira independente ao gradiente de concentração predominante no ambiente celular (ROBEY et al., 2018).

2.2.2. Atividade biológica dos transportadores ABC

O fato de pertencerem a uma superfamília proteica presente em todos os reinos da vida torna os transportadores ABC consideravelmente diversos no que diz respeito às suas atividades biológicas. Os membros desta família podem ser divididos em quatro grandes grupos, sendo três destes constituídos por proteínas de membrana: (i) importadores de nutrientes (majoritariamente transportadores ABC bacterianos), (ii) exportadores de diversas substâncias, como peptídeos, metabólitos e xenobióticos, sendo este grupo representado, dentre seus demais membros, pelos três principais transportadores ABC relacionados à MDR (P-gp, MRP1 e ABCG2), (iii) transportadores ABC que atuam como canais iônicos ou reguladores e (iv) proteínas ABC que não possuem TMDs e envolvem-se em processos de reparo e tradução (FORD, 2019). A extensa maioria das 48 proteínas ABC humanas é composta por transportadores de membrana (subfamílias ABCA-D e ABCG); algumas exceções destacam-se nestas famílias, como é o caso da ABCC7 (também conhecida por CFTR, *cystic fibrosis conductance regulator*), sobre a qual mais será dissertado adiante, além das proteínas ABCC8 e ABCC9, reguladores de canais de potássio do tipo Kir6.2, ATP-dependentes. Os membros das subfamílias restantes, E e F, participam, sem exceções, nos processos de tradução e reparo de DNA e são constituídos apenas por NBDs (SZÖLLŐSI et al., 2018).

Por meio do transporte ativo de moléculas através da membrana celular, descrito em detalhes anteriormente, a vasta maioria dos transportadores ABC atua na regulação dos níveis celulares de moléculas de extrema importância, como hormônios, lipídeos, íons, xenobióticos além de outras moléculas de pequeno porte. Ainda, estas proteínas participam de maneira crucial em processos fisiológicos como a regulação intracelular de organelas (mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, em destaque)(ROBEY et al., 2018).

A perda de função de um transportador ABC, via mutação gênica, associa-se à doenças hereditárias como a fibrose cística, à exemplo, cujo caso clínico deriva da mutação do regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR, codificado pelo gene *CFTR*, também conhecido como

ABCC7) e a sitosterolemia – patologia genética autossômica recessiva caracterizada por desordem do metabolismo lipídico – a qual deriva de mutações dos transportadores ABCG5 ou ABCG8 (NEUMANN; ROSE-SPERLING; HELLMICH, 2017; ROBEY et al., 2018).

Como evidenciado anteriormente, as variações estruturais e funcionais dos TMDs entre os membros da família ABC permitem que os mesmos possuam gamas de substratos extremamente variadas entre si, dos mais restritos e específicos aos mais amplos e não quimicamente relacionáveis. Merece destaque o fato de que são os transportadores ABC com amplos grupos de substratos que apresentam potencial para transportar agentes quimioterápicos, tendo seus níveis de expressão em células neoplásicas a capacidade de desencadear o fenômeno de MDR. Atualmente, sabe-se que 19 dos 48 transportadores ABC possuem capacidade de transportar drogas antineoplásicas, contudo, os três primeiros membros da família reportados como bombas de efluxo de múltiplas drogas e diretamente relacionados à MDR (P-gp, MRP1 e ABCG2) permanecem representando o maior percentual de esforços e investimentos científicos nesta área temática (ROBEY et al., 2018; WRIGHT et al., 2018).

Estes três, destacados acima, exercem funções essenciais de excreção e proteção fisiológica por meio do transporte de substâncias através de membranas celulares. A presença dos mesmos em barreiras biológicas – como a hematoencefálica, hematotesticular e hematoplacentária – expressos em células endoteliais capilares, evita a entrada de substâncias exógenas e, desta forma, é fundamental para a manutenção do processo contínuo de detoxificação celular. Esta atividade protetora de efluxo pode, no entanto, afetar negativamente parâmetros farmacocinéticos de drogas, alterando drasticamente os perfis de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade de um regime terapêutico que possa vir a ser estabelecido (CHEN et al., 2016; ROBEY et al., 2018).

A inibição de transportadores ABC frequentemente resulta em quadros clínicos de toxicidade ou alterações de perfis farmacocinéticos derivadas de interações entre drogas. Por esta razão, a FDA (*US Food and Drug Administration*) estabelece critérios rigorosos para guiar os processos de pesquisa e desenvolvimento de novas drogas de maneira a considerar suas

possíveis habilidades de interagir com esta classe de transportadores (ROBEY et al., 2018).

2.2.3. P-gp

Dentre os três transportadores ABC destacados anteriormente - diretamente relacionados ao fenômeno de MDR e, portanto, clinicamente mais relevantes – a proteína P-gp foi a primeira a ser descoberta e melhor caracterizada. Em 1976, Juliano e Ling descreveram-na como uma glicoproteína de superfície, localizada na membrana citoplasmática, e também demonstraram sua responsabilidade pelo fenótipo de resistência à múltiplas drogas em células tumorais resistentes ao tratamento quimioterápico, tratando-se, desta forma, de uma proteína capaz de transportar uma grande quantidade de substratos de classes químicas completamente diferentes e não relacionáveis, como drogas hidrofóbicas (colchicina, vinblastina, doxorubicina etc.) além de lipídeos, xenobióticos e peptídeos (SCHINKEL et al., 1994). Atualmente, seu amplo espectro de substratos encontra-se caracterizado quimicamente de maneira mais acurada, sendo composto por cátions anfipáticos e compostos orgânicos cujos pesos moleculares variam de 200 à aproximadamente 1900 Da (DALPIAZ; PAVAN, 2018).

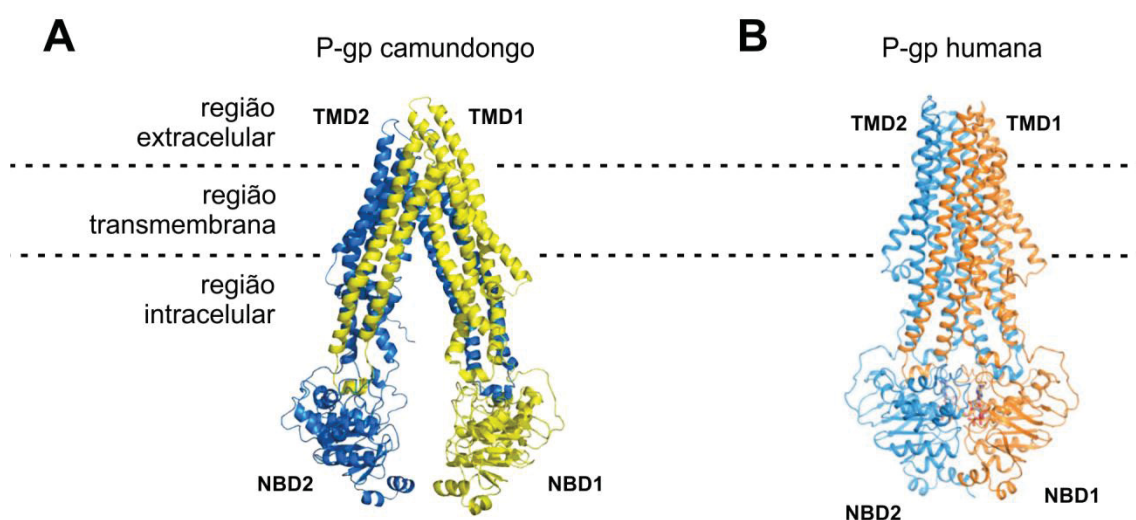
Em células normais, entretanto, a proteína P-gp também exerce importante papel fisiológico de proteção e detoxificação celular, atuando continuamente na remoção de metabólitos citotóxicos. Encontra-se altamente expressa em barreiras biológicas como a hematoencefálica, hematotesticular e hematoplacentária, além do intestino e da própria pele, limitando a absorção de toxinas presentes no ambiente e mantendo os níveis intracelulares de xenobióticos abaixo dos limites tóxicos. Verifica-se também a presença do transportador em tecidos hepáticos, renais, gastrointestinais e do sistema imunológico (TAMAKI et al., 2011).

Como consequência de seu papel protetor de exportação de substâncias do meio intracelular, a P-gp frequentemente representa uma preocupante influência na eficácia de tratamentos quimioterápicos, realizando o efluxo da medicação e não permitindo que a droga permaneça no interior da célula alvo

(sendo esta uma célula neoplásica que apresenta superexpressão do referido transportador) sob as condições necessárias de tempo e concentração para que o regime terapêutico seja efetivo. Apesar desta problemática participação na eficácia dos tratamentos quimioterápicos atuais, a P-gp possui enorme relevância clínica uma vez que a mesma regula a biodisponibilidade e perfil farmacocinético de muitas drogas, prevenindo absorções cerebrais, intestinais e placentárias de substâncias. Recentemente, a atividade transportadora da P-gp também tem sido explorada no processo de pesquisa e desenvolvimento da segunda geração de anti-histamínicos. A síntese destes novos fármacos que atuam como substratos do transportador P-gp possui o objetivo de evitar a recorrência de efeitos sedativos adversos, comumente observados nos medicamentos da primeira geração, limitando a penetração e permanência dos mesmos na barreira hematoencefálica (SZÖLLŐSI et al., 2018).

À nível estrutural, a P-gp é descrita como uma glicoproteína transmembrana composta por 1280 aminoácidos os quais conferem massa molecular de 170kDa. Sua estrutura funcional é formada por dois domínios transmembrana (TMDs) e dois domínios de ligação à nucleotídeo (NBDs) (ALLER et al., 2009) organizados em uma única cadeia polipeptídica (Fig. 6) (KIM; CHEN, 2018).

FIGURA 6 - ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DO TRANSPORTADOR P-GP



FONTE: Adaptado (ALLER et al., 2009; KIM; CHEN, 2018)

NOTA: (A) Estrutura da P-gp de camundongo, resolvida por cristalografia com resolução de 3.8 Å. (B) Estrutura da P-gp humana em seu momento conformacional com abertura voltada para o meio extracelular, resolvida por crio-microscopia eletrônica com resolução de 3.4 Å.

2.2.4. MRP1

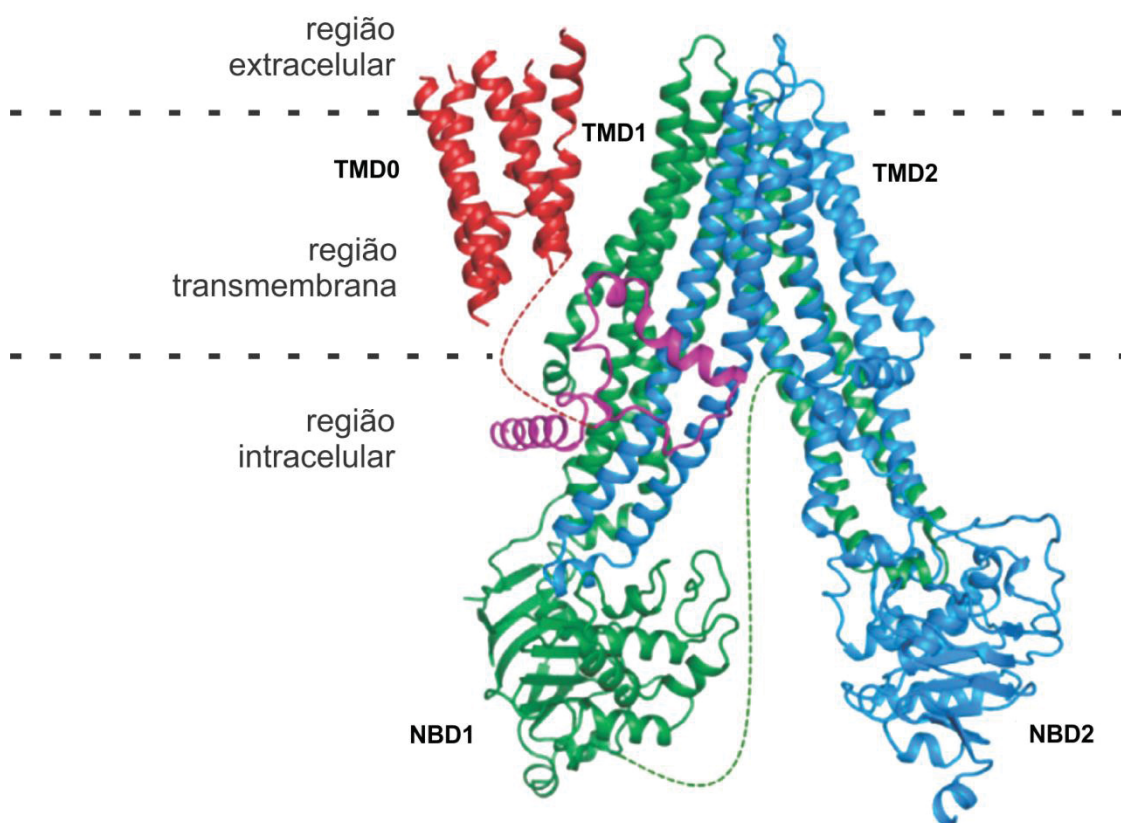
A proteína MRP1 (*multidrug resistance-associated protein 1* – codificada pelo gene *ABCC1*) foi o segundo membro da superfamília de transportadores ABC a ser identificado e relacionado à MDR, em 1992 por Cole e colaboradores, os quais relataram a existência de uma segunda bomba de efluxo, semelhante à já conhecida P-gp, em linhagem celular humana (NCI-H69 – *small-cell lung carcinoma*) (COLE et al., 1992). De maneira análoga à P-gp, tratava-se de uma proteína transportadora transmembrana capaz de exportar variados agente antineoplásicos, estruturalmente diversos entre si, como antraciclinas (STEFAN; WIESE, 2019), doxorubicina, vincristina e etoposídeo (ROBEY et al., 2018).

Apesar das similaridades funcionais evidenciadas entre os transportadores P-gp e MRP1, seus grupos de substratos diferem significativamente, mesmo apresentando uma grande sobreposição de substratos, essencialmente compostos quimioterápicos. MRP1 tende a transportar diversos compostos hidrofóbicos neutros e aniônicos e também é capaz de, exclusivamente, transportar produtos de fase II do metabolismo de drogas, incluindo diversos conjugados glutatiônicos e glucoronídeos, bem como glutathione em sua forma livre (ROBEY et al., 2018).

Assim como os demais transportadores ABC, MRP1 encontra-se amplamente distribuído no organismo, fazendo-se presente principalmente nos rins, intestino e cérebro (LESLIE; DEELEY; COLE, 2005), exercendo, desta forma, um importante papel quimioprotetor em múltiplos tecidos. O transportador também influencia a eficácia (e toxicidade) de medicamentos utilizados no regime terapêutico de doenças não malignas, exercendo o efluxo de uma ampla gama de antibióticos, opiáceos, agentes antivirais, antidepressivos (citalopram, à exemplo) e estatinas (COLE, 2014). 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).

No que diz respeito à sua arquitetura molecular, o transportador MRP1 possui uma particularidade incomum à superfamília ABC. Além do arranjo estrutural característico dos membros da referida família de proteínas (formado por dois TMDs e dois NBDs), a proteína apresenta um terceiro domínio transmembrana, TMD0 (NH₂-terminal), o qual estabelece poucos e limitados contatos com o restante da estrutura proteica (JOHNSON; CHEN, 2017). A representação tridimensional da estrutura em alta resolução tornou possível a caracterização mais detalhada de seu sítio de ligação de substrato, o qual é consideravelmente amplo e apresenta plasticidade estrutural, o que justifica o vasto grupo de substratos da proteína (KAPOOR et al., 2018).

FIGURA 7 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO TRANSPORTADOR MRP1



FONTE: Adaptado (JOHNSON; CHEN, 2017).

NOTA: estrutura da MRP1, resolvida por crio-microscopia eletrônica com resolução de 3.5 Å.

2.2.5. ABCG2

O transportador ABCG2 (também conhecido por BCRP – *breast cancer resistance protein* – codificado pelo gene *ABCG2*), segundo membro pertencente à subfamília G, foi o mais recentemente descoberto, em 1998, dentre os três principais transportadores ABC envolvidos diretamente na resistência à quimioterapia (TAYLOR et al., 2017). A sua identificação foi realizada por três grupos de pesquisadores distintos em relativa concomitância, em um breve período de poucos meses (ROBEY et al., 2018).

Utilizando a linhagem MCF-7/AdrVp (células de câncer de mama que não expressam P-gp tampouco MRP1 e exibem resistência tanto à adriamicina quanto ao verapamil), Doyle e colaboradores, através da técnica de *fingerprinting* de RNA, identificaram uma nova proteína, a qual recebeu o nome de BCRP (*breast cancer resistance protein*) por sua capacidade de promover resistência à quimioterapia em células mamárias neoplásicas (DOYLE et al., 1998). Posteriormente, tal descoberta foi replicada pelo próprio grupo de pesquisa em outras linhagens celulares, como as de carcinoma do cólon S1, carcinoma EPG-85-257 e fibrossarcoma EPF86-079 (DOYLE; ROSS, 2003). Outros dois grupos de pesquisa independentes identificaram, quase que simultaneamente à primeira descoberta de Doyle e colaboradores, proteínas que na época pareciam distintas de ABCG2 e, portanto, deveriam ser nomeadas conforme o modelo utilizado por cada laboratório. Uma destas descobertas ocorreu em uma linhagem de células de carcinoma de cólon humano (S1-M1-80), que era resistente à mitoxantrona, o que justifica a nomenclatura adotada, MXR (*Mitoxantrone Resistance*) (JANI et al., 2014; MIYAKE et al., 1999). O outro estudo se deu em células humanas placentárias, das quais derivou-se o nome ABCP (*ATP-Binding Cassette Placenta*) (ALLIKMETS et al., 1998). Apesar de diversos trabalhos da literatura reportarem-na como BCRP, atualmente a terminologia mais amplamente utilizada para a proteína é ABCG2, devido ao gene que a codifica.

Em tecidos normais, a proteína ABCG2 encontra-se altamente expressa principalmente na placenta (membrana apical dos sinciciotrofoblastos placentários), intestino (membrana de células epiteliais do intestino delgado), cólon e reto, fígado (membrana dos canalículos biliares formados por

hepatócitos adjacentes) e cérebro (membrana luminal de células endoteliais de microvasos cerebrais). Em menor grau, evidencia-se a expressão do transportador nos rins (membrana de células tubulares proximais) (NIELSEN et al., 2017) bem como na próstata, testículos, ovários, útero e sistema nervoso central (SNC) (PENA-SOLORZANO et al., 2016). Já no ambiente tumoral, o transportador é frequentemente expresso em células hematopoiéticas e linfoides malignas além de ser também reconhecido como marcador de células-tronco mielóides e leucêmicas imaturas. O ABCG2 também é altamente expresso em uma população celular denominada “*side population*” encontrada em uma ampla gama de tumores sólidos (cabeça e pescoço, mama e pulmão, à exemplo); estas células possuem propriedades semelhantes às das células-tronco: quiescência, resistência à quimioterapia (múltiplas drogas) e radioterapia, capacidade de auto-renovação aumentada e tumorigenicidade (NIELSEN et al., 2017; WIESE, 2015).

No que diz respeito às funções fisiológicas do transportador ABCG2, sua distribuição tecidual sugere um papel protetor extremamente relevante contra várias substâncias endógenas e xenobióticos, influenciando ativamente seus processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) (NIELSEN et al., 2017). A proteína atua prevenindo a absorção de compostos tóxicos pelo intestino, elevando seus índices de depuração hepatobiliar, e também previne que tais substâncias atravessem as barreiras hematoplacentária, hematoencefálica e hematotesticular (PENA-SOLORZANO et al., 2016). De maneira análoga, o transportador também influencia na ADME de drogas antineoplásicas (NATARAJAN et al., 2012). Por possuir uma vasta especificidade de substratos, com relativa preferência por compostos hidrofóbicos, planos e policíclicos (JACKSON et al., 2018), uma considerável quantidade de agentes quimioterápicos compõem a relação de substratos do transportador, dos quais destacam-se o metotrexato (MTX), mitoxantrona (MXR), inibidores das topoisomerasas I ou II, tais como topotecano e doxorrubicina, e SN-38 (metabólito ativo do irinotecano), o que contribui para a explicação de diversas falhas observadas no atual regime terapêutico aplicado ao câncer (PENA-SOLORZANO et al., 2016; WIESE, 2015).

A proteína também exerce diversas outras funções biológicas em múltiplas regiões do organismo, consideravelmente distintas entre si, porém

sempre norteadas pelo propósito de proteção celular através do efluxo de substratos citotóxicos, das quais encontram-se destacadas e descritas na Tabela 1.

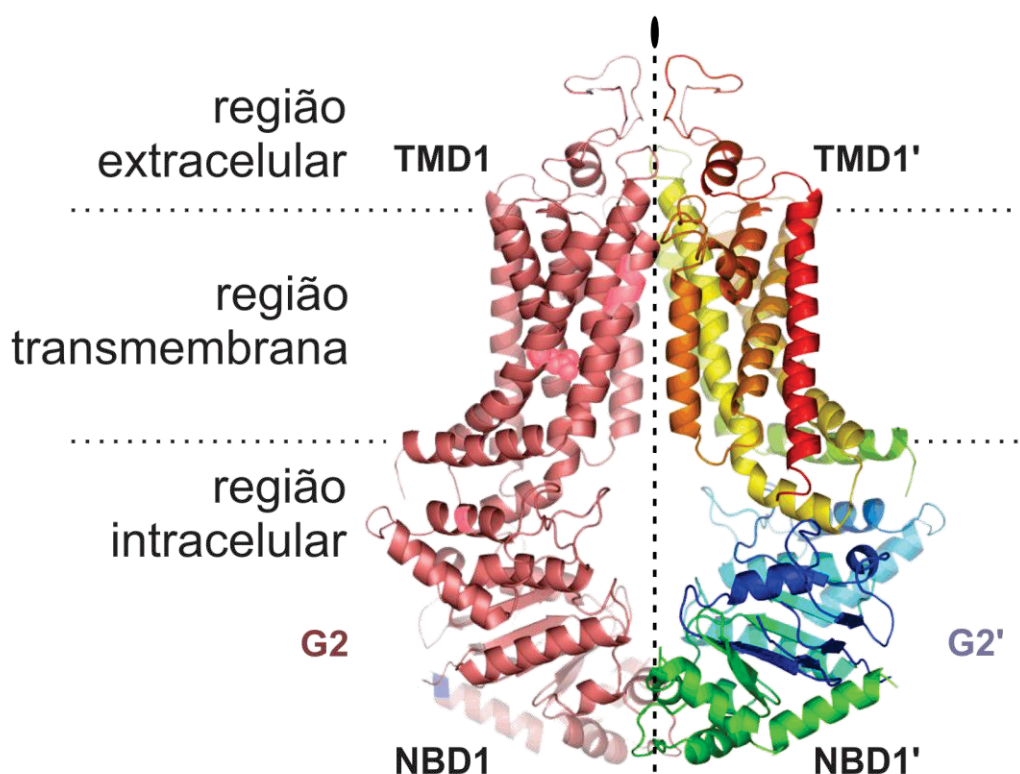
TABELA 1 - FUNÇÕES E SUBSTRATOS DO TRANSPORTADOR ABCG2

Localização fisiológica	Atividade biológica
Trato gastrointestinal	Redução da absorção de drogas (e.g. camptotecinas, inibidores de tirosinaquinases, prazosina, estatinas, inibidores de HIV proteases); depuração renal de ácido úrico
Canalículos hepáticos	Excreção biliar de drogas e metabólitos (SN-38, à exemplo)
Barreira hematoencefálica	Redução da penetração de drogas (opioides) no SNC
Glândulas mamárias e placenta	Papéis fisiológicos contraditórios? Proteção do feto vs. excreção de toxinas e nutrientes no leite materno
Sistema hematopoiético	Efluxo de porfirinas

FONTE: Adaptado (KAPOOR et al., 2018).

Quanto à sua estrutura, ABCG2 é uma glicoproteína composta por 655 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 72kDa. Assim como outros membros da subfamília G, trata-se de um transportador incompleto 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 144kDa (Fig. 8) (TAYLOR et al., 2017).

FIGURA 8 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO TRANSPORTADOR 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.

2.2.6. Uso de inibidores em transportadores ABC

A utilização de inibidores, os quais atuam no bloqueio da atividade de efluxo exercida pelos transportadores ABC, é considerada a estratégia mais promissora e eficiente para reverter o quadro de resistência à múltiplas drogas gerado por estas proteínas. Algumas características devem ser consideradas durante o processo de pesquisa e desenvolvimento de novos inibidores e constituem detalhes cruciais para a obtenção de compostos seguros e eficazes: (i) possuir alta afinidade pelo transportador alvo, resultando em eficácia à baixas concentrações, (ii) ser específico para apenas um transportador, uma vez que a inibição simultânea de muitos ou todos os transportadores ABC pode influenciar negativamente o processo natural de detoxificação celular de um organismo saudável (iii) não realizar interações

farmacocinéticas com os quimioterápicos que serão administrados em associação, (iv) não ser transportado (reconhecido como substrato) pela proteína alvo, pois não permaneceria ligado ao transportador o suficiente para que houvesse atividade inibitória do mesmo antes de ser prontamente transportado, e (v) apresentar baixa toxicidade (BOUMENDJEL et al., 2011).

O emprego de inibidores dos transportadores ABC na clínica é questionado por alguns grupos de pesquisa justamente pelas importantes funções fisiológicas exercidas pelas proteínas desta família (BERGER et al., 1999). O tema evidencia novamente a já mencionada necessidade de se pesquisar e desenvolver compostos específicos para cada transportador alvo, os quais inibiriam seletivamente suas atividades biológicas. As similaridades estruturais apresentadas pelos membros da família ABC resultam no compartilhamento de funções fisiológicas por vários deles e, desta forma, o bloqueio seletivo de um transportador envolvido diretamente com o fenômeno de MDR não comprometeria as atividades biológicas dos demais transportadores ABC, fato que garantiria a manutenção do processo natural de detoxificação celular exercido pelos mesmos. A identificação dos níveis de superexpressão de transportadores ABC nos diversos tipos neoplásicos facilitaria ainda mais a determinação de um protocolo terapêutico acurado, seguro e eficiente.

O processo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos geralmente se dá em três fases, que determinam quão avançado está o desenvolvimento clínico de um dado composto. Na fase I ocorrem os estudos de determinação de dose, cujo objetivo principal é definir a dose ótima (segura e potencialmente eficaz) do fármaco em desenvolvimento para que o estudo possa avançar para a próxima fase. O principal objetivo a ser alcançado na fase II é identificar sinais de eficácia do composto em uma determinada população de pacientes. Na fase III, por fim, dois tratamentos são comparados entre si. Em pesquisas que objetivam a reversão da resistência à drogas, o composto com potencial inibitório em desenvolvimento também deve passar por ensaios clínicos de três fases, porém, considerando o fato de que inibidores raramente apresentam atividade intrínseca, o composto é testado em associação com um agente antineoplásico que já tenha comprovado segurança e eficácia nas duas primeiras fases do ensaio clínico e, caso dados

promissores sejam coletados, as duas substâncias (quimioterápico e composto em estudo) são testadas individualmente para fins comparativos (TAMAKI et al., 2011).

2.2.6.1. Uso de Inibidores no transportador ABCB1 (P-gp)

O fato da descoberta da P-gp ter ocorrido há mais de 40 anos naturalmente justifica os avanços observados no desenvolvimento de inibidores para a referida proteína, o qual já se encontra na fase clínica. Tais inibidores são divididos em três gerações: a primeira é composta por substâncias que já são aprovadas pelo U.S. FDA para outros usos terapêuticos, a segunda é composta por substâncias desenvolvidas especificamente para atuarem como inibidores da P-gp e a terceira compreende compostos que também foram desenvolvidos para este fim porém não apresentam interações farmacocinéticas consideráveis (TAMAKI et al., 2011).

A primeira geração de inibidores da P-gp inclui drogas como o verapamil, quinidina e ciclosporina A. De maneira geral, estes compostos mostraram-se pouco eficazes ou eficazes apenas em dosagens consideradas tóxicas, no entanto, alguns resultados promissores (exemplificando, observou-se que a associação de quinina à quimioterapia elevou os índices de remissão e sobrevida nos quadros clínicos de síndrome mielodisplásica Pgp-positiva) comprovaram o benefício da administração de inibidores de transportadores ABC associados ao regime quimioterápico na clínica oncológica e estimulou pesquisadores a insistirem no desenvolvimento de potentes inibidores de bombas de efluxo de substâncias (TAMAKI et al., 2011).

A motivação gerada pelos dados promissores anteriormente mencionados levaram ao desenvolvimento da 2ª geração de inibidores da P-gp, com o intuito de se alcançar maior potência que a de seus antecessores. Destacam-se neste grupo drogas o elacridar (GF120918), valspodar (PSC-833) e o biricodar (VX-710) (ALLEN et al., 2015). Apesar de apresentarem maior afinidade pela P-gp, menores índices de toxicidade e alguns resultados positivos (à exemplo, observou-se uma associação positiva do valspodar à quimioterapia em um subgrupo de pacientes acometidos por leucemia com

detectável efluxo de drogas, uma vez que os pacientes apresentaram melhores índices de remissão e sobrevida) (FRIEDENBERG et al., 2006), os inibidores apresentaram interações farmacocinéticas, como inibição de enzimas do citocromo P450, que alteravam drasticamente a biodisponibilidade dos quimioterápicos administrados em associação à eles. A metabolização diminuída do agente antineoplásico elevava a exposição à droga, aumentando consideravelmente a ocorrência e severidade dos efeitos adversos associados ao regime quimioterápico (FRIEDENBERG et al., 2006). Resultados similares foram observados em outros inibidores da 2ª geração, fato que, somado à incapacidade de replicação dos resultados positivos coletados, acarretou na descontinuação das drogas em questão.

Os maiores desafios observados nas gerações anteriores (alta toxicidade, baixa potência e interações farmacocinéticas significativas) foram superados na 3ª geração de inibidores da P-gp, composta por drogas como tariquidar (XR9576), zosuquidar (LY335979), laniquidar (R101933) e CBT-1 (TAMAKI et al., 2011). O tariquidar, assim como o inibidor de 2ª geração elacridar, apresenta potencial inibitório frente aos transportadores P-gp e ABCG2 (ROBEY et al., 2005). Apesar de não ter apresentado interações farmacocinéticas relevantes em estudos de fase I (ABRAHAM et al., 2009), o composto apresentou elevados índices de toxicidade em testes clínicos de fase III (FOX; BATES, 2007). A recorrência de resultados não promissores, apresentados por outras drogas da 3ª geração (MORSCHHAUSER et al., 2007; RUFF et al., 2009) levantou questionamentos acerca da utilização de inibidores de transportadores ABC em associação com agentes quimioterápicos: alguns grupos de pesquisa chamaram a atenção para o fato de que outros mecanismos de resistência, possivelmente mais importantes, se fazem presentes no organismo, o que torna a estratégia proposta insuficiente para superar os desafios apresentados pela MDR; outros grupos científicos questionam os resultados obtidos até então, uma vez que os mesmos foram conduzidos sob ausência de monitoramento dos níveis de expressão de P-gp tampouco MRP1 e ABCG2, o que poderia justificar os resultados negativos obtidos nos testes de inibição da P-gp. Estes pesquisadores sugerem a identificação de inibidores específicos de cada transportador e o uso de um

coquetel de inibidores em futuros testes clínicos (ROBEY et al., 2018; TAMAKI et al., 2011).

2.2.6.2. Uso de inibidores no transportador ABCC1 (MRP1)

No início do processo de desenvolvimento de inibidores dos transportadores ABC, a grande maioria dos inibidores de MRP1 foi descoberta indiretamente, durante testes que objetivavam identificar novos inibidores da P-gp. Ao longo dos últimos 40 anos, aproximadamente, diversas estratégias foram aplicadas para superar o fenômeno de MDR mediado pela superexpressão de MRP1, dentre as quais a grande maioria possuía como foco as propriedades inibitórias de drogas conhecidas como moduladores da P-gp (verapamil, ciclosporina A e valspodar, por exemplo). Apesar de resultados promissores *in vitro* quando associações com agentes antineoplásicos eram estabelecidas, os resultados clínicos não se mostraram satisfatórios, tal como o histórico já apresentado de desenvolvimento de inibidores da P-gp, no qual nenhum composto que tenha passado por testes clínicos tenha sido aprovado (LHOMMÉ et al., 2008; WANG et al., 2013). Claramente, novas estratégias se faziam necessárias para que avanços pudessem novamente ser observados nesta linha de pesquisa.

Grupos de pesquisa especialistas em MRP1 sugerem duas novas estratégias para que o processo de desenvolvimento de novos inibidores de MRP1 seja revisitado e recupere seu merecido destaque na ciência: (i) abordagem combinada de vários compostos que possuam atuação no fenômeno de MDR mediado por MRP1 (neste caso, espera-se que possíveis efeitos aditivos e sinérgicos possam eliminar, de forma mais seletiva e eficaz, células malignas superexpressando o transportador, além de reduzir efeitos colaterais dos tratamentos como evidente consequência da diminuição da dose única de cada composto quando associados em uma abordagem poliadjuvante) e (ii) desenvolvimento de inibidores não seletivos que sejam capazes de inibir a proteína bem como estruturas-alvo relacionadas à mesma. Foram identificados diversos compostos capazes de interferir relevantemente em etapas cruciais do processo de resistência à múltiplas drogas mediado por MRP1 (a curcumina, à exemplo, é depletora de GSH, inibidora de GST,

inibidora da atividade ATPásica de MRP1 além de possuir potencial inibitório frente às funções de transporte da referida proteína); a combinação destas substâncias, administradas em concentrações subtóxicas, pode representar uma importante contribuição aos esforços já empregados para superar clinicamente o fenômeno de MDR mediado por MRP1 (STEFAN; WIESE, 2019).

2.2.6.3. Uso de inibidores do transportador ABCG2 (BCRP)

Por se tratar do transportador ABC diretamente relacionado à MDR mais recentemente descoberto, o processo de pesquisa e desenvolvimento de inibidores do ABCG2 não se encontra em estágios tão avançados quanto os anteriormente descritos, porém seu potencial como adjuvante em regimes farmacoterápicos, especialmente protocolos quimioterápicos, angariou grandes esforços para identificar inibidores específicos da proteína (ROBEY et al., 2018).

O primeiro inibidor identificado, a toxina fúngica fumitremorgin C (FTC), é seletivo para ABCG2, porém apresentou efeitos neurotóxicos indesejáveis e, por esta razão, teve seu desenvolvimento descontinuado (WIESE, 2015). Para reduzir a neurotoxicidade, análogos tetracíclicos do FTC foram desenvolvidos, dentre os quais o Ko143 merece destaque por apresentar maior potência e menores índices tóxicos que seu precursor. Apesar das melhorias destacadas, o Ko143 não se mostrou estável em plasma de camundongos e apresentou efeitos não específicos quando em altas concentrações, inibindo adicionalmente os transportadores P-gp e MRP1. Também investiu-se esforços no desenvolvimento de um inibidor seletivo para ABCG2 derivado do tariquidar, inibidor de 3ª geração da P-gp que apresentou potencial para ser substrato de ABCG2 (JACKSON et al., 2018; PUENTES et al., 2011).

Assim como o FTC, outros inibidores da tirosina quinase (como o sunitinib, nilotinib, sorafenib e imatinib) são capazes de sensibilizar células superexpressando ABCG2 através de substâncias citotóxicas originalmente reconhecidas como substratos da proteína, como o topotecan e SN-38 (DOHSE et al., 2010). Todavia, ensaios clínicos envolvendo esta classe de compostos de maneira isolada ou combinados com outros substratos

citotóxicos de ABCG2 apresentaram resultados divergentes: (i) ensaios clínicos de fase III empregando sunitinib associado ao regime quimioterápico FOLFIRI (regime quimioterápico padrão para casos de câncer colorretal metastático) foram descontinuados devido à elevação de efeitos adversos e ausência de melhorias nos índices de sobrevida (CARRATO et al., 2013), enquanto (ii) ensaios clínicos de fases I e II demonstraram resultados promissores provenientes da administração de sorafenib associado ao irinotecan em pacientes que já haviam apresentado resistência frente à regimes quimioterápicos à base de irinotecan anteriormente (SAMALIN et al., 2014; WESTOVER; LI, 2015).

Os últimos anos foram marcados por esforços voltados ao desenvolvimento de inibidores seletivos e atóxicos de ABCG2 através da modificação estrutural de inibidores já conhecidos (JUVALE; WIESE, 2015). Tratam-se de séries de compostos quimicamente não relacionáveis - tais como flavonas (GALLUS; JUVALE; WIESE, 2014), cromonas (VALDAMERI; GENOUX; PERES, 2012) e chalconas (RANGEL et al., 2013; VALDAMERI et al., 2012; WINTER et al., 2014) – as quais têm demonstrado dados promissores neste segmento de pesquisa. Ainda seguindo o foco majoritário de seu processo de desenvolvimento (alterações químicas no arcabouço molecular de inibidores já identificados), esforços têm sido empregados na identificação de novos inibidores de ABCG2 através de triagens virtuais baseada em ligantes de compostos presentes no banco de dados de drogas aprovadas pela U.S. FDA (PAN; CHOTHE; SWAAN, 2013). Diversas drogas com propriedades farmacológicas já conhecidas estão sendo testadas frente ao transportador ABCG2, sendo que muitas delas demonstraram-se potenciais substratos e/ou inibidores da referida proteína (Quadro 1).

QUADRO 1 - PRINCIPAIS SUBSTRATOS E INIBIDORES DO TRANSPORTADOR ABCG2

Substratos	Inibidores
Citotóxicos tradicionais	Acrilonitrilas
Mitoxantrona	YHO-13177
Etoposídeo	Drogas Anti-HIV
Doxorrubicina	Efavirenz
Daunorrubicina	Flavonóides
Epirubicina	Auronas
Topotecano	Chalconas
Irinotecano	Cromonas
SN-38 ^a	Flavonol
5-fluorouracil	Flavanona
Metotrexato	Flavona
Cladribina	Isoflavanona
Clofarabina	Isoflavona
6-mercaptopurina	Rotenóides
Flavopiridol	Análogos do FTC^d
Inibidores da tirosina quinase	KO143
Imatinib	Produtos naturais
Dasatinib	Antibióticos (Novobiocina)
Nilotinib	Curcuminóides (Curcumina)
Sorafenib	Metabólitos fúngicos (Ciclosporina A)
Sunitinib	Substâncias Marinhas (Citarabina)
Gefitinib	Metabólitos (ATRA) ^e
Erlotinib	Estilbenos
Rucaparib	Derivados do Tariquidar
Agentes PDT^b	UR-ME22-1
Feoforbídeo A	Inibidores da tirosina quinase
Clorina e6	Sunitinib
HPPH ^c	Outros
Ácido 5-Aminolevulínico	Acridonas
Porfímero Sódico	Anti-helmínticos (Triclabendazol)
	Hormônios (17β-Estradiol)

Quinases (CDK) ^f
Xantinas (1,3,7-metilxantina)

FONTE: Adaptado (PENA-SOLORZANO et al., 2016; WESTOVER; LI, 2015).

NOTA: Classes de substratos e inibidores de ABCG2 destacadas em negrito, seguidas de alguns de seus principais representantes.

LEGENDA: ^a Metabólito ativo do irinotecano

^b Terapia fotodinâmica (*Photodynamic therapy*)

^c 2-(1-Hexiloxietil)-2-divinil pirofeoforbídeo A

^d Fumitremorgin C

^e Tretinoína, também conhecida como *all trans retinoic acid*

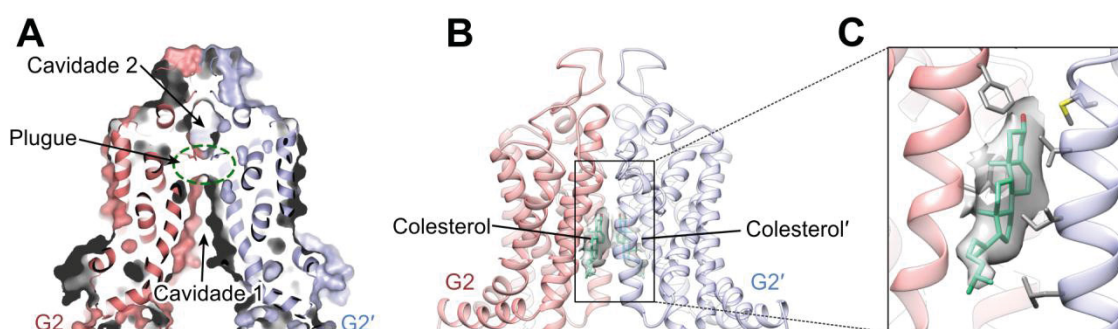
^f Proteínas quinase dependentes de ciclinas

É importante ressaltar que todas as estratégias mencionadas foram conduzidas sem o apoio de esclarecimentos quanto à estrutura da proteína, uma vez que a mesma teve sua estrutura completamente elucidada recentemente, em 2017 (TAYLOR et al., 2017). Desconhecer os mecanismos através dos quais pequenas moléculas interagem, modulam ou inibem o ABCG2 certamente justifica a grande maioria das falhas observadas ao longo do seu processo de desenvolvimento de inibidores específicos.

A estrutura resolvida por Taylor e colaboradores (Fig. 9A) revelou uma conformação composta por uma cavidade central, profunda e com formato semelhante a uma fenda, com abertura voltada para o meio intracelular. Esta cavidade (denominada cavidade 1) estabelece contato com o citoplasma e com a porção interna da bicamada lipídica. Um plugue formado por resíduos de leucina separa a cavidade 1 de uma cavidade secundária, menor, menos acessível e localizada abaixo dos *loops* mais externos da estrutura proteica, denominada cavidade 2. Dadas suas características, esta cavidade aparenta possuir menor afinidade por substratos, o que pode contribuir para a liberação de moléculas de substrato para o meio extracelular durante o ciclo de transporte realizado por ABCG2. Devido ao fato da cavidade 1 ser maior e possuir natureza hidrofóbica, a cavidade 1 é considerada um sítio de ligação de múltiplas drogas, cuja geometria favorece a ligação de compostos hidrofóbicos, planos e policíclicos (características já identificadas para substratos de ABCG2) (TAYLOR et al., 2017), distinguindo o transportador ABCG2 da P-gp e MRP1, os quais formam cavidades globulares (ALLER et al., 2009; JOHNSON; CHEN, 2017).

Adicionalmente à elucidação estrutural da proteína, revelou-se a presença de duas moléculas de colesterol ligadas à cavidade 1 (Fig. 9B-C), sugerindo fortemente uma potencial localização onde substratos de ABCG2 como a estrona-3-sulfato (também conhecida por E1S, a qual, juntamente com E2S – estradiol – e E3S – estriol – compõem os três tipos do hormônio estrogênio) ligam-se ao transportador (JOHNSON; CHEN, 2017).

FIGURA 9 - RECENTES ELUCIDAÇÕES ESTRUTURAIS ACERCA DO TRANSPORTADOR ABCG2



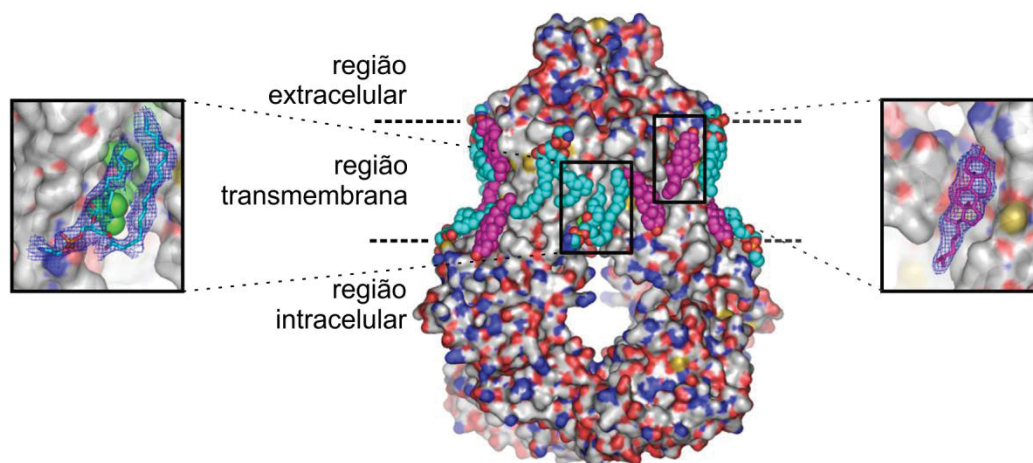
FONTE: Adaptado (TAYLOR et al., 2017).

NOTA: (A) Representação da superfície dos TMDs formados pela unidade funcional do transportador, homodimerizada. Simulação de corte sagital com o intuito de evidenciar as cavidades 1 e 2 e o plugue de leucina, devidamente sinalizados na imagem. (B) Estrutura dos TMDs, também formados pelo homodímero funcional, com duas moléculas de colesterol ligadas à eles, sinalizadas em verde. Em A e B, os monômeros de ABCG2 encontram-se destacados em tons de cor de rosa e azul e denominados G2 e G2'. (C) Ampliação de parte da imagem observada em B para proporcionar uma observação mais detalhada de uma molécula de colesterol ligada às hélices dos TMDs.

A resolução da estrutura do transportador ABCG2 trouxe à tona o interesse antigo de se conhecer os mecanismos que definem como e onde pequenas moléculas interagem com a proteína. Johnson e colaboradores buscaram identificar se outras moléculas de inibidores específicos de ABCG2 seriam capazes de se ligar à cavidade 1 tal como o colesterol. Derivados do Ko143 e do tariquidar, compostos com conhecida afinidade pelo transportador, foram sintetizados e, através da técnica de crio-microscopia eletrônica de alta resolução, o grupo de pesquisadores demonstrou, dentre outras importantes informações, a íntima relação que o tamanho das moléculas de inibidores possui com o resultado de inibição completa do transportador ABCG2 (JOHNSON; CHEN, 2017).

As imagens em alta resolução permitiram a visualização e melhor caracterização das interações lipídicas estabelecidas para o transportador ABCG2. Diferentemente do que foi observado por Taylor e seus colaboradores, desta vez foram identificadas cinco moléculas de colesterol e cinco moléculas de fosfolipídeos por monômero, fortemente ligadas à porções hidrofóbicas da molécula, formando um cinturão ao redor da proteína (Fig. 10). Observou-se também que os fosfolipídeos obstruem a entrada da membrana da proteína e, portanto, devem mover-se para permitir o acesso e ligação de moléculas à cavidade 1. Acredita-se que as moléculas de colesterol sejam importantes para o funcionamento do transportador, uma vez que já tenha sido demonstrado que a proteína localiza-se em bolsões lipídicos da membrana plasmática, onde há elevadas concentrações de colesterol (JOHNSON; CHEN, 2017; SZILAGYI et al., 2017). Esta hipótese é fortalecida pelo fato de que membranas de células insetos que expressam ABCG2 possuem atividade ATPase apenas quando moléculas de colesterol são adicionadas (SZENTE et al., 2007).

FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DE SUPERFÍCIE DO TRANSPORTADOR ABCG2 E SUAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES LIPÍDICAS

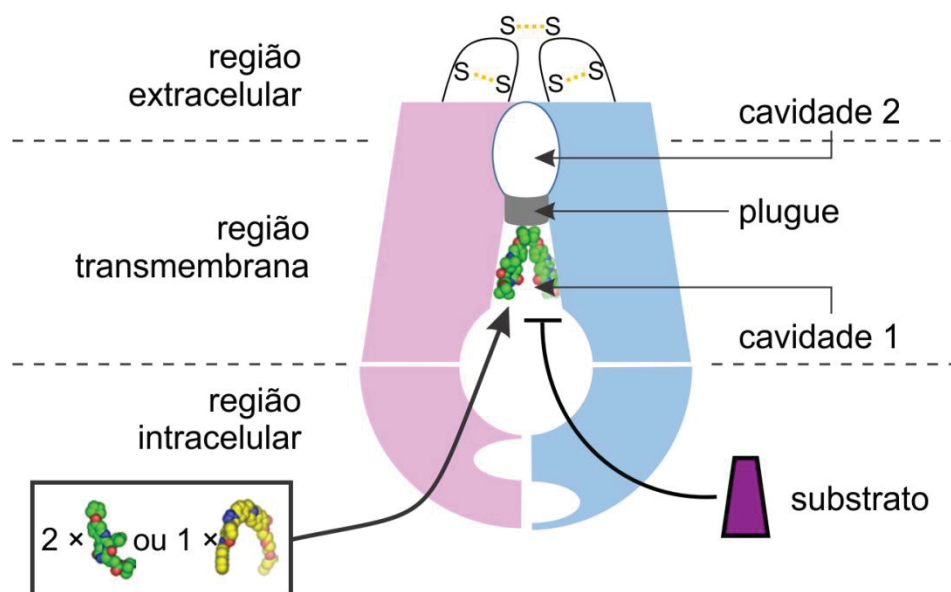


FONTE: Adaptado (JOHNSON; CHEN, 2017).

NOTA: Representação de superfície do transportador ABCG2, com o cinturão lipídico evidenciado em azul (fosfolipídeos) e cor de rosa (colesterol). Na ampliação à esquerda, uma molécula de inibidor de ABCG2 derivado do Ko143, destacada em verde, encontra-se ligada à cavidade 1 e circundada por fosfolipídeos que provavelmente moveram-se para permitir seu aporte. A ampliação à direita oferece mais detalhes da acomodação de uma molécula de colesterol em região hidrofóbica da proteína.

Demonstrou-se também a possibilidade de uma ou duas moléculas de inibidor ligarem-se, dependendo de seus tamanhos, à cavidade 1 (Fig. 11). Ensaio de inibição da atividade ATPásica demonstraram que, sob as mesmas proporções de transportador e inibidor (1:1), uma pequena molécula de inibidor era capaz de causar um impacto na atividade enzimática 50% menor que o impacto observado quando uma determinada molécula com o dobro de seu tamanho era testada (Fig. 12). Estes resultados podem indicar duas possibilidades: (i) uma única pequena molécula pode ligar-se à cavidade 1, ocupando-a incompletamente. Esta possibilidade justificaria a redução observada na atividade máxima esperada, uma vez que todas as unidades de ABCG2 se encontrariam parcialmente inibidas (Fig. 12B); (ii) para que se verifique atividade inibitória, duas pequenas moléculas devem se ligar à cavidade 1, ocupando-a completamente. Tal possibilidade também sustentaria o resultado de atividade reduzida, pois metade do total de unidades de ABCG2 se encontraria totalmente inibida e a outra metade permaneceria ativa (Fig. 12C) (TAYLOR et al., 2017).

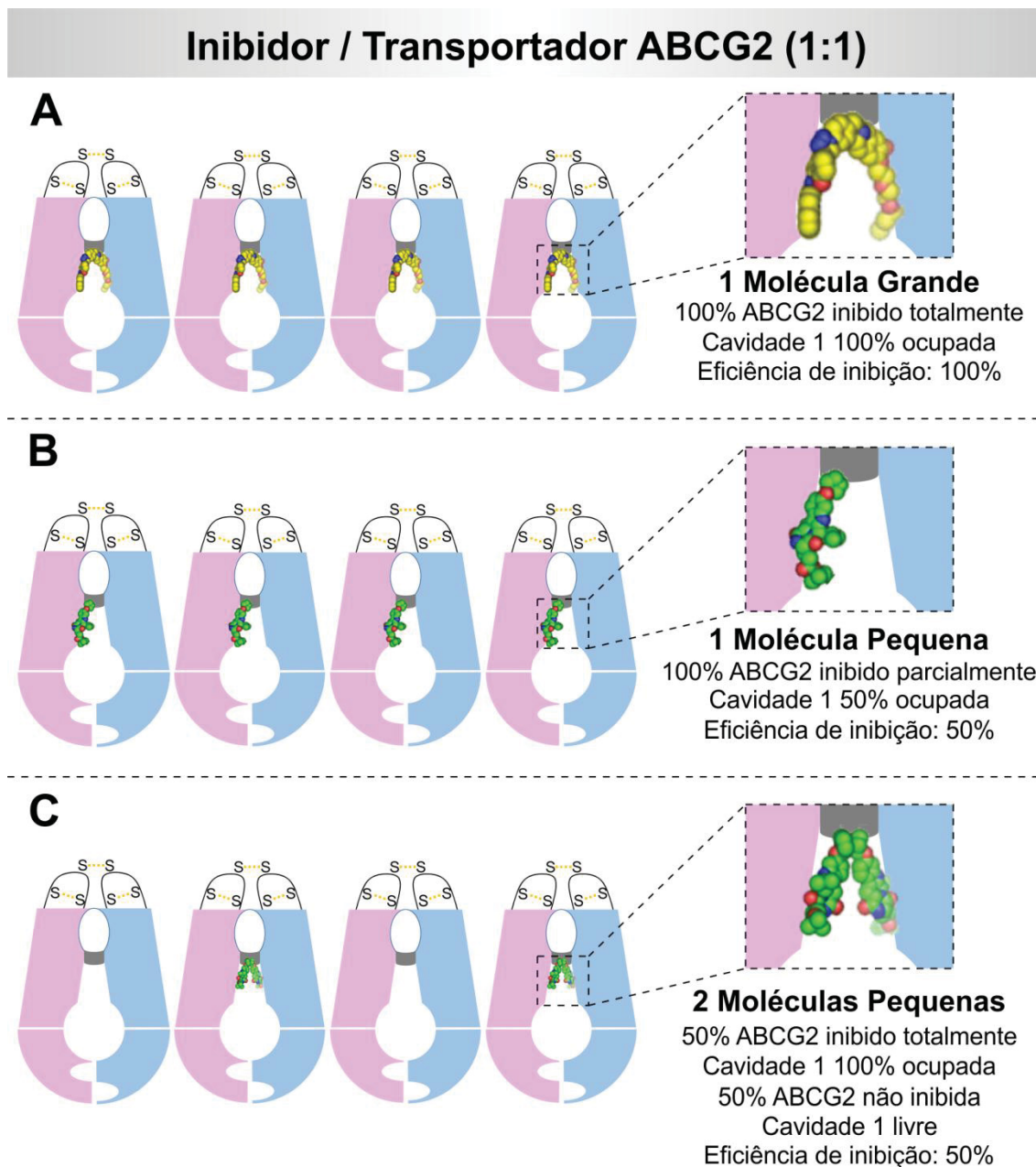
FIGURA 11 - POSSIBILIDADES DE OCUPAÇÃO DA CAVIDADE 1 E CONSEQUENTE IMPEDIMENTO DO APORTE DE SUBSTRATOS DE ABCG2



FONTE: Adaptado (JOHNSON; CHEN, 2017).

NOTA: Representação esquemática da inibição de ABCG2 por pequenas e grandes moléculas. Faz-se necessária a ligação de duas pequenas moléculas (representadas em verde) ou uma única molécula com o dobro de seu tamanho (representada em amarelo) para bloquear completamente a cavidade 1, impedindo o acesso de moléculas de substrato.

FIGURA 12 - POSSIBILIDADES DE INTERAÇÃO ENTRE ABCG2 E SEUS INIBIDORES



FONTE: Adaptado (JOHNSON; CHEN, 2017).

NOTA: Representação esquemática das possibilidades de interações entre o transportador ABCG2 e pequenas e grandes moléculas gerando inibição total ou parcial da referida proteína. Em proporções equimolares de transportador e inibidor (1:1), moléculas pequenas podem inibir parcialmente o transportador ABCG2 de duas maneiras distintas (B e C) enquanto moléculas grandes inibem totalmente o transportador ABCG2 de uma única maneira (A).

Para o caso específico do transportador ABCG2, ainda não existem inibidores seletivos para a proteína que já tenham sido direcionados à etapa de testes clínicos do processo de desenvolvimento de drogas, tornando-se de

extrema importância a identificação e caracterização de novas moléculas que apresentem as características cruciais, mencionadas anteriormente, para obtenção de compostos promissores (ROBEY et al., 2018). É indiscutível o fato de que as descobertas mais recentes tenham fornecido uma base estrutural de extrema importância para o futuro desenvolvimento de novos inibidores específicos da proteína.

2.3 CARBAZOLES

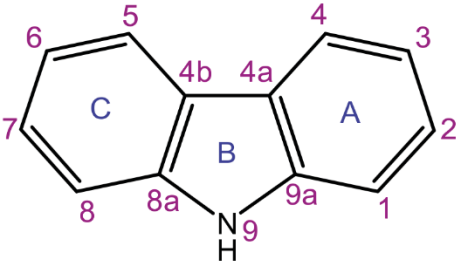
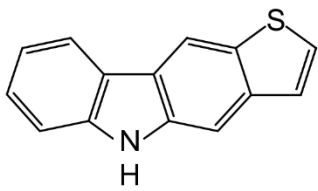
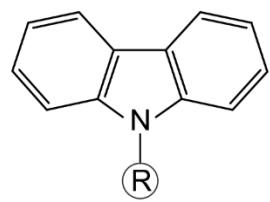
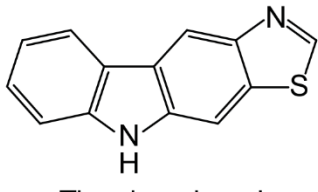
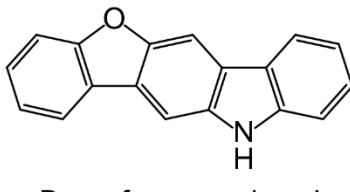
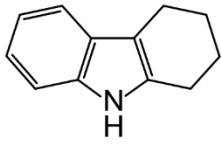
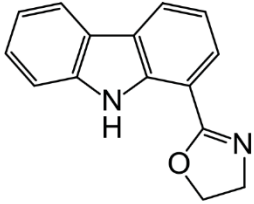
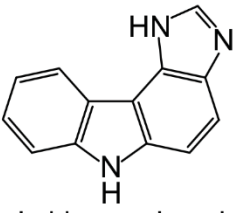
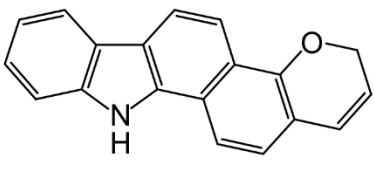
Por estarem intimamente envolvidos em diversos processos biológicos, os compostos heterocíclicos atraem muitos esforços científicos da área da química medicinal para obtenção de novas drogas. Diversos compostos heterocíclicos com conhecidas atividades farmacológicas já são utilizados na clínica (vincristina, morfina e sulfadiazina, à exemplo) (BASHIR et al., 2015). O carbazol, um composto heterocíclico aromático, é um importante representante desta classe de compostos e está presente em uma ampla variedade de substâncias medicinais ativas de origem natural (KNÖLKER; REDDY, 2002).

Há mais de um século, em 1872, Graebe e Glaser foram os pioneiros a descrever o composto original 9H-carbazol, obtido a partir da destilação do carvão. Noventa anos depois, a divulgação das propriedades antimicrobianas da murraianina (3-formil-1-metoxycarbazol), isolada das cascas de caule da planta *Murraya koenigii*, atraiu muito interesse dos pesquisadores da época. As propriedades químicas e biológicas do carbazol sustentam o aquecido desenvolvimento de derivados da substância (SCHMIDT; REDDY; KNÖLKER, 2012).

O composto possui uma estrutura tricíclica, composta por dois anéis benzênicos fundidos a um anel de cinco membros contendo um átomo de nitrogênio. Diversos derivados de carbazoles já foram sintetizados e apresentaram importantes atividades farmacológicas (NAGAPPAN et al., 2011), tais como ação antioxidante (GUILLONNEAU et al., 1999), anti-inflamatória (BANDGAR et al., 2012), antibiótica (BIAMONTE; WANNER; LE ROCH, 2013), antitumoral (CARUSO et al., 2008) entre outras. No quadro 2 é

possível observar a molécula do carbazol em detalhes seguida de alguns derivados já sintetizados.

QUADRO 2 - CARBAZOL - PRECURSOR E ALGUNS DERIVADOS

 Carbazol	
 Tienocarbazol	 Carbazol N-substituído
 Tiazolocarbazol	 Benzofurano carbazol
 Tetrahidro carbazol	 Oxazolinil carbazol
 Imidazocarbazol	 Benzopiranocarbazol

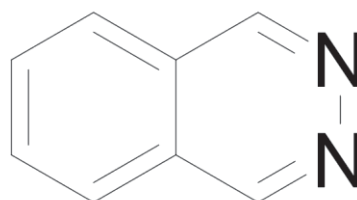
FONTE: Adaptado (BASHIR et al., 2015).

Após a identificação de atividade inibitória exercida pelo piridocarbazol frente à caseína quinase 2 (CK2), uma proteína envolvida em diversas

patologias incluindo vários tipos de câncer (NGUYEN et al., 2010), pesquisadores conduziram trabalhos para verificar a atividade de derivados de carbazoles enquanto inibidores de transportadores ABC. Estudos foram conduzidos envolvendo o oxazinocarbazol. Após síntese e realização de diversos ensaios biológicos, algumas atividades biológicas puderam ser averiguadas. Apesar de não ter sido observada atividades antimicrobianas e inibitórias frente ao transportador ABCG2, a pesquisa apresentou resultados promissores quanto à inibição da CK2 (BOUAZIZ et al., 2014).

Mais recentemente, novos derivados de carbazoles foram sintetizados a partir da fusão de derivados da ftalazina e outros compostos cíclicos com o intuito de se avaliar as atividades biológicas das substâncias resultantes. Numerosos estudos demonstraram que derivados da ftalazina possuem importantes atividades biológicas (antitumoral, antimicrobiana, antioxidantes entre outras) (LAMERA et al., 2017; SHAO et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA FTALAZINA

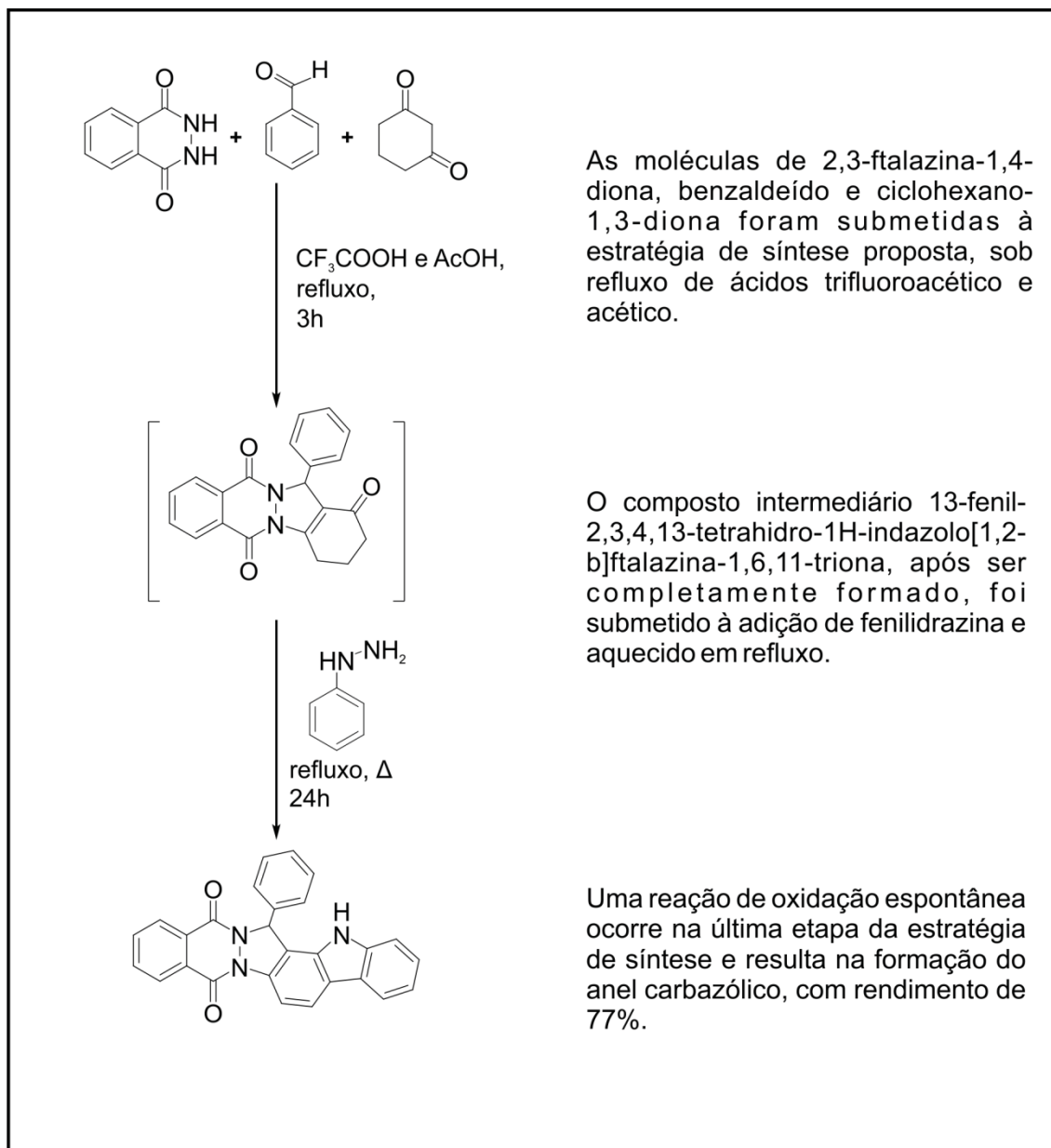


Ftalazina

Fonte: O Autor (2019).

Foi proposta uma estratégia de síntese combinando MCR (reação multicomponente) e Indolização de Fischer. Esta última caracteriza-se pela formação de grupos aromáticos heterocíclicos indol a partir de fenilidrazina, cetona ou aldeído em meio ácido. A reação foi do tipo “*one-pot reaction*” (estratégia para melhorar a eficiência de reações químicas a partir da utilização de um único recipiente para abrigar todas as etapas do processo de síntese de compostos) (LAMERA et al., 2017) e encontra-se descrita resumidamente no quadro 3.

QUADRO 3 - SÍNTESE DE DERIVADOS POLICÍCLICOS DO CARBAZOL A PARTIR DO ESQUEMA MCR/INDOLIZAÇÃO DE FISCHER

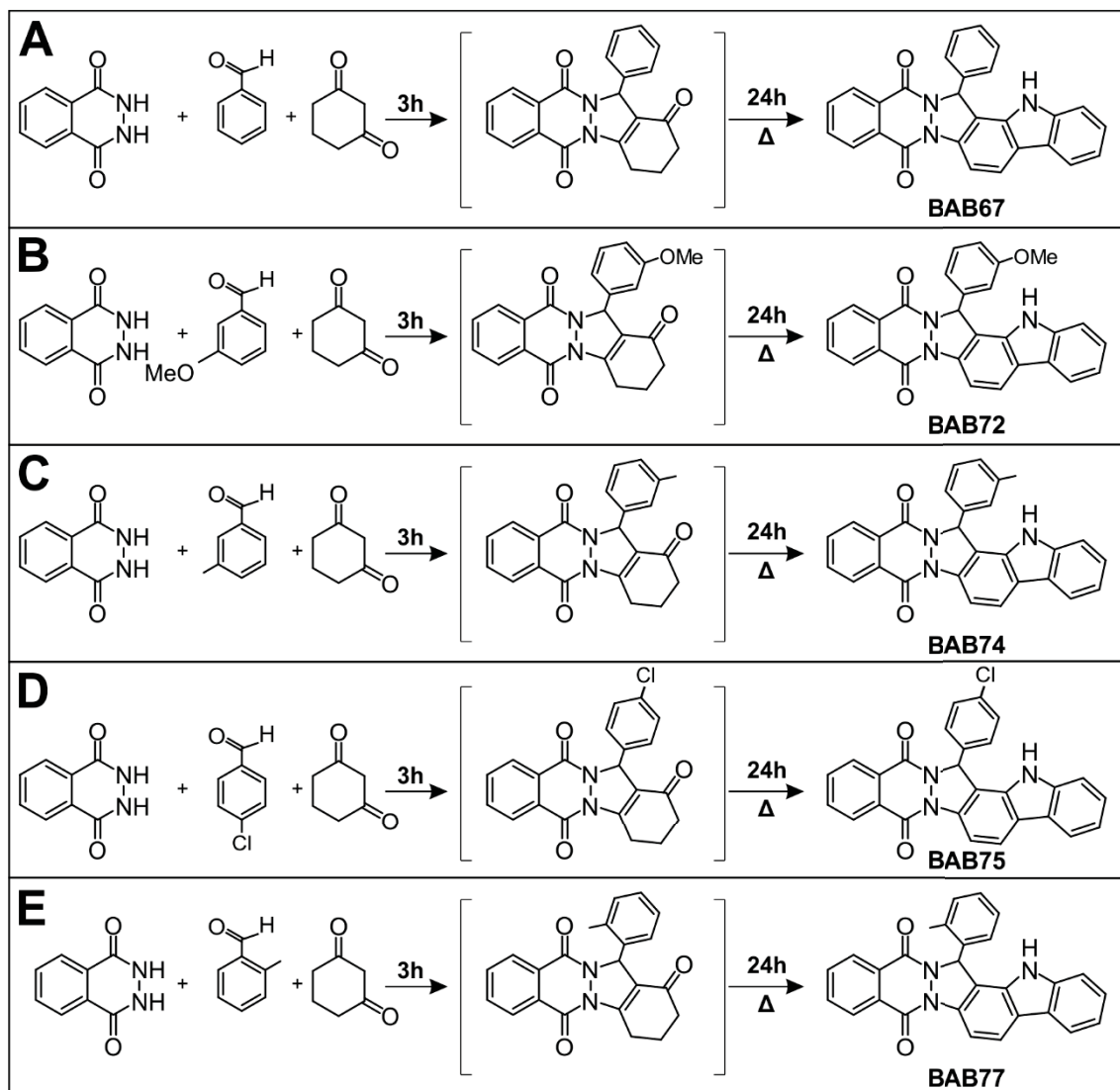


FONTE: Adaptado (LAMERA et al., 2017).

A reação foi conduzida empregando diferentes benzaldeídos substituídos e rendimentos considerados de bons à excelentes foram observados após utilização tanto de substituintes retiradores quanto doadores de elétrons. O fato de nenhuma classe de substituintes ter representado impactos negativos no rendimento da reação permitiu que diversos outros derivados policíclicos do carbazol fossem sintetizados a partir desta estratégia química (LAMERA et al., 2017).

Os derivados utilizados neste estudo foram obtidos a partir do esquema de reações detalhado anteriormente e suas reações de síntese simplificadas seguidas do produto final obtido podem ser observadas a seguir, no quadro 4.

QUADRO 4 - DERIVADOS POLICÍCLICOS DE CARBAZOLES UTILIZADOS NESTE TRABALHO E SUAS RESPECTIVAS REAÇÕES DE SÍNTESE SIMPLIFICADAS



Fonte: O Autor (2019).

NOTA: Utilização de diferentes moléculas de benzaldeídos para obtenção dos derivados de carbazoles utilizados no presente estudo. (A) benzaldeído para obtenção do BAB67, (B) benzaldeído meta substituído por um grupamento metoxi para obtenção do BAB72, (C) benzaldeído meta substituído por um grupamento alquila para obtenção do BAB74, (D) benzaldeído para substituído por um grupamento halogênico para obtenção do BAB75 e (E) benzaldeído orto substituído por um grupamento alquila para obtenção do BAB77.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar o efeito de derivados de carbazoles como novos inibidores seletivos do transportador ABCG2 com características que viabilizem futuros estudos pré-clínicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um *screening* com todos os derivados de carbazoles para avaliá-los quanto aos seus perfis inibitórios, seletivos e citotóxicos frente ao transportador ABCG2;
- Identificar o derivado de carbazoles mais promissor através da determinação da razão terapêutica (RT) dos compostos testados;
- Caracterizar o mecanismo de inibição do transportador ABCG2 realizado pelo composto mais promissor, avaliando sua independência frente à diferentes substratos, aspectos cinéticos bem como seus efeitos sobre o reconhecimento do anticorpo conformacional 5D3 e sobre a atividade ATPase da referida proteína;
- Realizar um estudo *in silico* através de *docking* para identificar o sítio de ligação do composto mais promissor no transportador ABCG2;
- Avaliar a utilidade clínica do composto mais promissor, verificando a evolução de seu perfil inibitório em relação ao tempo e seu efeito na reversão da resistência mediada pelo transportador ABCG2 em ensaios de longa duração.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DERIVADOS DE CARBAZOLES UTILIZADOS

Os derivados de carbazoles testados foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marc Le Borgne da *Université Claude Bernard Lyon 1, Institute of Pharmaceutical and Biological Sciences*, Lyon - França.

4.2 SOLUÇÕES

Os compostos foram dissolvidos em DMSO (Merck) para que soluções estoque de 10, 50 e 100 mM fossem obtidas. As soluções em DMSO foram estocadas à -20°C e descongeladas no momento da utilização, quando diluições foram realizadas em meio de cultura para se obter as concentrações desejadas em cada experimento (0,1 – 100 µM).

4.3 LINHAGENS CELULARES

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

A tabela 2 apresenta um breve compilado de detalhes acerca das linhagens utilizadas no presente estudo, como informações referentes aos processos de transfecção, condições especiais de cultivo e tratamentos empregando agentes de seleção específicos (substância e concentração) para assegurar os níveis de superexpressão dos referidos transportadores ABC de interesse durante a execução da pesquisa. Adicionalmente, diversas outras ações de controle compõem a rotina laboratorial para preservação da integridade das linhagens celulares utilizadas ao longo do estudo, das quais

destacam-se: (i) realização diária de análise microscópica sob múltiplos aumentos para verificação das características morfológicas de cada linhagem bem como prevenção de eventos de contaminação e/ou ações tratativas quando baixas concentrações de inóculo são identificadas, (ii) acompanhamento e manutenção, através de análises microscópicas e técnicas de repique, dos níveis de confluência dos tapetes celulares cultivados em monocamada (garrafas de cultivo) para garantir os padrões morfológicos e de divisão das linhagens e (iii) realização de ensaios experimentais com células obtidas a partir da tripsinização de tapetes celulares apresentando 80-90% de confluência para assegurar a caracterização das linhagens ao longo das replicatas realizadas.

TABELA 2 - LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS

Tipo celular	Linhagens parentais	Transfecção (modo / vetor)	Linhagens transfectadas (linhagem- <i>GENE</i>)	Condições de cultivo	Agente de Seleção
Fibroblasto (humano)	HEK293 WT	Estável / pcDNA3	HEK293-ABCG2	Meio de cultura com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina e streptomomicina). Controles adicionais de umidade, pressão (5% de CO ₂) e temperatura (37° C).	G418 (0,75 mg mL ⁻¹)
Fibroblasto (camundongo)	NIH3T3 WT	Estável / pcDNA3	NIH3T3-ABCB1		Colchicina (60 ng mL ⁻¹)
Fibroblasto (hamster)	BHK21 WT	Estável / pNUT	BHK21-ABCC1		Metotrexato (0,1 mg mL ⁻¹)

Fonte: Adaptado (CARDARELLI et al., 1995; CHANG; HOU; RIORDAN, 1997; ROBEY et al., 2003).

4.4 IDENTIFICAÇÃO *IN VITRO* DE INIBIDORES DOS TRANSPORTADORES ABC (ABCG2, P-GP E MRP1)

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após 24 horas de adesão as células foram tratadas com Mitoxantrona (5 μ M) ou outros substratos, como Rhodamina 123 (5 μ M) ou Calceína-AM (0,01 μ M) por 30 minutos à 37°C na presença ou ausência de diferentes concentrações dos derivados de carbazoles testados neste estudo ou inibidores de referência. Após a incubação, as células foram lavadas com solução salina (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. 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 HEK293 – ABCG2 incubadas com inibidores de referência (Ko143 à 0,5 μ M para ABCG2, GF 120918 à 0,5 μ M para P-gp e Verapamil à 30 μ M para MRP1) (ROBEY et al., 2001). Os resultados, expressos como percentuais de inibição em relação ao controle positivo, foram calculados conforme racional apresentado no Anexo 1. Os valores de IC₅₀ e IG₅₀ foram calculados utilizando o programa GraphPadPrism.

4.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO E EFEITO SOBRE A REVERSÃO DA RESISTÊNCIA MEDIADA PELO TRANSPORTADOR ABCG2 ATRAVÉS DE ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Foi utilizado o método MTT para avaliar a viabilidade celular (HEO et al., 1990). Células HEK293-ABCG2 e HEK293 *wild type* foram plaqueadas em placas de 96 poços (1,5x10⁴ células por poço). Após 24 horas de adesão as células foram tratadas com concentrações crescentes dos derivados de carbazoles (0,39 – 100 μ M) por 72 horas para obtenção dos dados de citotoxicidade dos derivados de carbazoles. Para os ensaios de reversão da resistência em células que superexpressam ABCG2, o ensaio de viabilidade

celular foi realizado na presença de SN-38 (10 nM), em co-tratamento com o BAB75, composto mais promissor da série testada, em concentrações de 0,49 e 10 μ M (IC_{50} e concentração saturante, respectivamente) por 72 horas para obtenção dos dados de reversão da resistência. Em ambas as situações, o período de incubação ocorreu sob as condições de 37°C e 5% CO_2 . O controle de 100% de células viáveis foi realizado com meio de cultura (contendo 0,1% de DMSO (v/v)) sem o composto a ser analisado no experimento e o controle de 100% de morte celular foi realizado com 1% de detergente *Triton*. Após o período de incubação, o tratamento foi removido e 100 μ L de solução de MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) em PBS (0,5mg/mL – concentração final) foram adicionados e seguidos por outro período de incubação de 4 horas, sob as mesmas condições já mencionadas, possibilitando o processo de metabolização do MTT. 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).

4.6 ENSAIO DE LAVAGEM

Células HEK293-*ABCG2* foram plaqueadas em placas de 24 poços (1,5 x 10⁵ células por poço). Após um período de 48 horas para que uma confluência de 80-90% fosse atingida, as células foram tratadas com o BAB75 na concentração final de 10 μ M (concentração saturante) e incubadas por 30 minutos à 37 °C. Posteriormente, o meio com inibidor foi removido e as células foram lavadas com PBS e incubadas apenas com meio de cultura à 37 °C por diferentes períodos de tempo (0 min, 30 min e 3 h). Após os diferentes períodos de incubação, adicionou-se mitoxantrona como substrato (5 μ M) e a placa foi incubada novamente sob as mesmas condições já mencionadas. Após a incubação, as células foram lavadas com solução salina (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 conforme descrito anteriormente.

4.7 MICROSCOPIA CONFOCAL

Células HEK293-ABCG2 foram plaqueadas (1×10^5 células por poço) em placa de 24 poços contendo lamínulas para microscopia e incubadas sob condições de 37 °C e 5% CO₂ por 48 horas 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 BAB75 na concentração de 10 µM (saturante) na presença do substrato fluorescente de ABCG2 Hoechst 33342 (1 µM) por 30 minutos 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. Os resultados, expressos como dados qualitativos da atividade de transporte do substrato Hoechst 33342 mediado pelo transportador ABCG2, oferecem uma análise visual comparativa do potencial de inibição realizado pelo derivado de carbazoles em relação aos controles negativo (ausência de inibidores) e positivo (presença do inibidor de referência Ko143).

4.8 MÉTODOS COMPUTACIONAIS

Estudos moleculares de *docking* foram realizados utilizando a estrutura do transportador ABCG2 depositada no PDB (*Protein Data Bank*) sob o código ID 5NJG. A molécula do BAB75 teve sua estrutura otimizada utilizando o programa Mopac 2016 (<http://openmopac.net/MOPAC2016.html> | acessado em 08/04/2019) através do método PM6. As estruturas do transportador e do inibidor foram preparadas para utilização via AutoDock Vina (<http://vina.scripps.edu/> | acessado em 08/04/2019) utilizando AutoDock Tools versão 4.2 (<http://autodock.scripps.edu/downloads/autodock-registration/autodock-4-2-download-page/> | acessado em 08/04/2019). Num primeiro momento, o *docking* foi realizado em toda a proteína, considerando

diversas áreas e extensões para identificar a região mais adequada, através de uma função de classificação empírica, calculada pelo Autodock Vina, a qual considera os valores de energia livre de ligação encontrados em cada região da molécula. Após a identificação desta região, um quadro de busca com dimensões de 20 x 25 x 20 Å foi delineado e alocado no centro do transportador e um número máximo de 10 modos de ligação foi determinado. Os modelos de *docking* do BAB75 e suas interações com o transportador ABCG2 (sítio de ligação e principais aminoácidos envolvidos na interação) foram visualizados utilizando os programas Discovery Studio Visualizer versão 4.5 (<https://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization.html> | acessado em 08/04/2019) e PYMOL versão 1.8.5.1 (<https://github.com/schrodinger/pymol-open-source> | acessado em 08/04/2019).

4.9 MEDIDA DA ATIVIDADE ATPASE DO TRANSPORTADOR ABCG2

A medida da atividade ATPase do transportador ABCG2 foi realizada quantificando o fosfato inorgânico liberado de moléculas de ATP por um ensaio colorimétrico (*ATPase/GTPase Activity Assay Kit* – Sigma Aldrich) (POZZA et al., 2006). Células HEK293-ABCG2 foram coletadas por tripsinação e centrifugadas sob as condições de 1500xg, 4 °C por 3 minutos. Uma vez retirado o sobrenadante, o pellet formado foi ressuspenso em PBS para lavagem e centrifugado sob as mesmas condições já mencionadas. Este processo foi realizado duas vezes. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspenso em tampão de lise, parte integrante do kit utilizado para realização da técnica, incubado por 10 minutos em gelo e centrifugado sob as condições de, aproximadamente, 15000xg, 4 °C e 10 minutos para clarificação do extrato de proteínas. O extrato foi mantido em nitrogênio líquido e descongelado no momento da utilização, quando diluições foram realizadas para que os dados obtidos se encontrassem dentro da curva de calibração do ensaio. Em placas de 96 poços, adicionou-se 5 µL do extrato protéico (aproximadamente 5×10^5 células por poço), 20 µL de tampão de ensaio e 5 µL do BAB75 (10 µM). Utilizou-se três tipos de controle para o ensaio: (i) branco (25 µL de tampão de ensaio e 5 µL de DMSO) para que seu valor de

absorbância fosse descontado de todas as demais leituras e não representasse interferência nos dados obtidos; (ii) negativo (20 μ L de tampão de ensaio, 5 μ L do extrato protéico e 5 μ L de DMSO) representando a atividade ATPase máxima devido à ausência de inibição; (iii) positivo (20 μ L de tampão de ensaio, 5 μ L do extrato protéico e 5 μ L de ortovanadato de sódio, composto inorgânico que conhecidamente inibe a atividade ATPase de transportadores ABC, em concentração final de 6 mM). Todos os poços encontravam-se em volume final de 30 μ L. A placa foi mantida em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente e, após este período, 10 μ L de ATP foram adicionados perfazendo uma concentração final de 4 mM. Após um período de incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 200 μ L de reagente Verde de Malaquita. Após uma nova incubação, sob as mesmas condições, o fosfato liberado foi quantificado a partir da determinação da absorbância sob o comprimento de onda de 620 nm, utilizando um leitor de microplaca Multiscan FC (Thermo Scientific). Os resultados foram expressos como percentual de inibição em relação ao controle positivo.

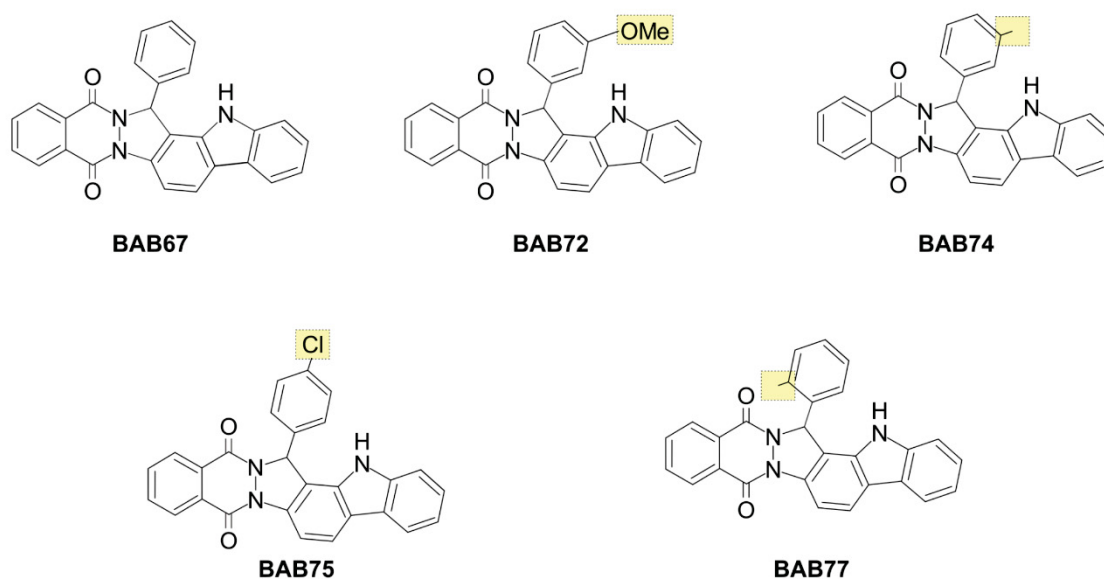
4.10 USO DO ANTICORPO CONFORMACIONAL 5D3

As células HEK293-ABCG2 foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após um período de 48 horas, as mesmas foram coletadas por tripsinização e centrifugadas à 1000xg por 3 minutos. O pellet foi ressuspenso em 0,1 mL de PBS contendo BSA (0,04 mg/mL). A suspensão de células foi incubada com os compostos (inibidores e substratos em concentrações saturantes) por 10 minutos à 37°C e posteriormente incubada com 1 μ L do anticorpo 5D3 (BD Pharmingen) perfazendo uma diluição de 1:100, por 30 minutos à 37°C. Após esta etapa, as células foram centrifugadas à 1000xg por 3 minutos e o pellet ressuspenso em 0,1 mL de PBS. Em seguida as células foram incubadas com 0,5 μ L do anticorpo secundário conjugado com PE (Abcam) perfazendo uma diluição de 1:200 por 30 minutos à 37°C. Após esta etapa, as células foram centrifugadas à 1000xg por 3 minutos e o pellet ressuspenso em 0,3 mL de PBS sendo imediatamente analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como uma razão em relação ao controle.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como evidenciado anteriormente, na contextualização teórica apresentada na seção 2.2.6 da revisão de literatura, o processo de desenvolvimento de inibidores do transportador ABCG2 ainda não identificou compostos que apresentassem um perfil seletivo para a proteína e, adicionalmente, características que viabilizassem futuros estudos clínicos. O estágio menos avançado deste processo, naturalmente correlacionado à data de descoberta do referido transportador, reafirma a urgência da identificação e caracterização de novos inibidores seletivos para ABCG2 e sustenta os objetivos almejados no presente estudo. Fundamentada neste conceito, a pesquisa foi conduzida a partir da avaliação dos derivados de carbazoles apresentados na figura 14, os quais distinguem-se entre si pela presença ou ausência de um único grupamento substituinte.

FIGURA 14 - DERIVADOS DE CARBAZOLES AVALIADOS NO PRESENTE ESTUDO



Fonte: O Autor (2019).

NOTA: Os derivados de carbazoles apresentados, também denominados “BABs” seguidos de numeração sequencial respeitando a lógica sintética da série obtida, diferenciam-se entre si pelos grupamentos substituintes destacados em amarelo.

Estabeleceu-se um racional para condução da pesquisa com o intuito de otimizar a avaliação dos derivados de carbazoles quanto aos seus perfis frente ao transportador ABCG2, o qual buscou organizar os resultados obtidos em

cada etapa do processo em um fluxo contínuo e lógico de ações e, consequentemente, viabilizar a demonstração consistente do alcance dos objetivos específicos deste estudo. Para melhor compreensão, o mesmo encontra-se dividido em duas etapas distintas (Fig. 15).

A primeira etapa compreende o *screening* inicial a ser realizado envolvendo todos os compostos da série em estudo, o qual integra testes delineados para identificar as principais características que, preliminarmente, determinam o potencial de um dado composto para atuar como inibidor da atividade de efluxo mediada pelo transportador ABCG2. O processo inicia-se buscando avaliar a capacidade inibitória dos derivados de carbazoles frente ao transportador ABCG2 (Fig. 15A). A seguir, faz-se necessário avaliar o perfil seletivo para ABCG2 dos compostos, testando a capacidade inibitória dos mesmos frente aos transportadores P-gp e MRP1, os quais também relacionam-se diretamente ao fenômeno de MDR (Fig. 15B). A importância de um perfil seletivo apresentado por inibidores do transportador ABCG2 merece ser salientada novamente, visto que tal característica não representa impactos às atividades biológicas dos demais transportadores ABC, assegurando a manutenção dos processos naturais de proteção e detoxificação celular, exercidos por grande parte dos membros desta superfamília de proteínas; ainda, os ensaios de seletividade foram conduzidos empregando concentrações mais elevadas que as utilizadas nos ensaios de inibição prévios com o intuito de garantir a permanência do perfil seletivo dos compostos mesmo quando em condições extrapoladas de tratamento.

Avançando conforme o racional estabelecido e seguindo os critérios clássicos de desenvolvimento de novos inibidores de transportadores ABC, busca-se determinar os valores de IC_{50} (Fig. 15C) e IG_{50} (Fig. 15D) dos compostos, os quais representam as concentrações para exercer 50% de suas capacidades inibitórias totais e reduzir em 50% o total de células viáveis após tratamento com os mesmos, respectivamente. De modo suplementar, a razão terapêutica (IG_{50}/IC_{50}) dos compostos deve ser obtida (Fig. 15E), a qual associa-se intimamente com os perfis de eficácia (potência) e segurança (citotoxicidade) de fármacos em desenvolvimento e constitui um ponto crítico do processo, no qual diversos compostos têm seus estudos descontinuados por não apresentarem resultados satisfatórios.

Os ensaios elaborados para avaliar os perfis inibitórios dos compostos (Fig. 15A-C) foram realizados por citometria de fluxo, cuja metodologia encontra-se elucidada na seção de materiais e métodos, ítem 4.4 e o ensaio para investigar o perfil citotóxico dos derivados de carbazoles foram realizados conforme o método de MTT, descrito em detalhes na seção de materiais e métodos, ítem 4.5. A conclusão da primeira etapa caracteriza-se pela identificação do composto mais promissor da série testada (Fig. 15F), através da análise simples dos valores de razão terapêutica (RT) obtidos anteriormente. Os índices de segurança e eficácia de um dado fármaco são diretamente proporcionais aos seus valores de RT, logo, o maior valor de RT obtido indica a substância mais promissora da série avaliada.

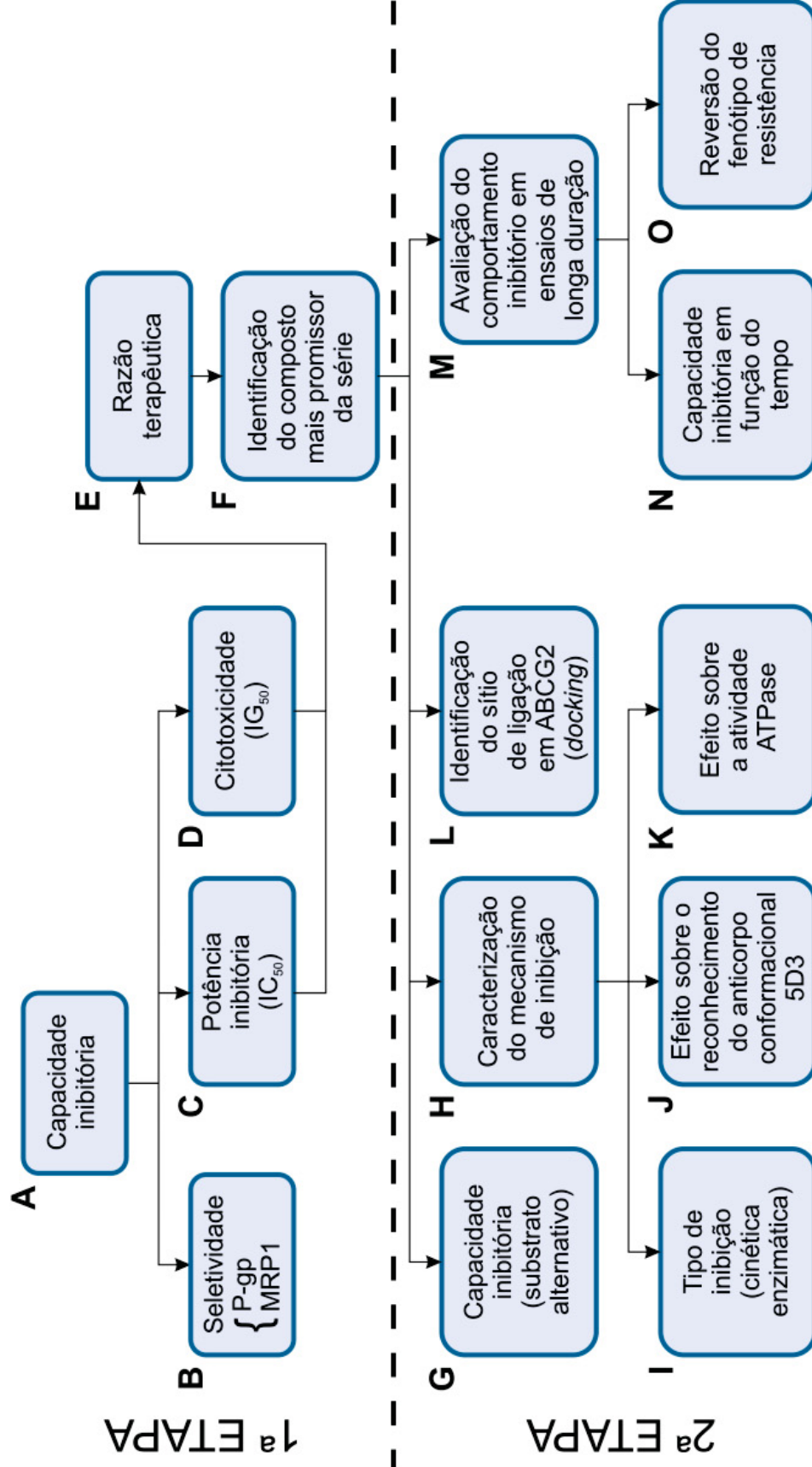
A segunda etapa abrange testes mais refinados, delineados com o objetivo de caracterizar o derivado de carbazoles selecionado na etapa anterior quanto ao seu mecanismo de inibição, suas interações moleculares com o transportador ABCG2 e seu comportamento em ensaios de longa duração. É de extrema importância conhecer detalhadamente o processo inibitório de um dado composto bem como as principais consequências biológicas de sua administração para confirmar sua real utilidade em futuros estudos clínicos. Esta etapa inicia-se buscando verificar se a capacidade inibitória do composto é do tipo substrato independente (Fig. 15G), através de ensaios qualitativos de microscopia confocal, cuja metodologia encontra-se descrita na seção de materiais e métodos, índice 4.7. A conservação de seu potencial inibitório em ensaios que empregam substratos alternativos assegura a eficácia do inibidor quando administrado em diferentes protocolos de associações terapêuticas.

Prosseguindo, os ensaios planejados com o intuito de caracterizar o mecanismo de inibição executado pelo composto (Fig. 15H) correspondem a testes que buscam categorizar este processo conforme premissas constantes na literatura; Buscou-se verificar (i) o tipo de inibição realizado pelo derivado de carbazoles (Fig. 15I), analisando o perfil cinético deste processo, (ii) os possíveis efeitos alostéricos decorrentes da ligação inibidor-transportador, os quais podem impactar o reconhecimento do transportador por anticorpos conformacionais (Fig. 15J) e (iii) os possíveis efeitos sobre a atividade ATPásica do transportador ABCG2 quando o mesmo tem sua atividade de efluxo inibida pelo inibidor em questão (Fig. 15K). Merece ênfase o fato de que

os inibidores de ABCG2 já descritos na literatura apresentam-se em expressiva maioria como inibidores do tipo não competitivos, inibidores da atividade ATPase da proteína alvo e indutores de efeitos alostéricos que representam um sutil aumento no reconhecimento de anticorpos conformacionais. Todavia, a identificação de inibidores que não se enquadram ao padrão verificado até o presente momento não os desqualificam enquanto potenciais compostos para este fim. Os ensaios para verificação do tipo de inibição se deram via citometria de fluxo; a verificação de efeitos sobre o reconhecimento do anticorpo conformacional 5D3 ocorreu conforme metodologia descrita na seção de materiais e métodos, item 4.10 e a avaliação dos efeitos sobre a atividade ATPase foi realizada conforme metodologia descrita na seção de materiais e métodos, item 4.9.

Após o processo de caracterização, é pertinente avaliar as interações moleculares entre o derivado de carbazoles e o transportador ABCG2 a fim de fundamentar o comportamento inibitório verificado ao longo da pesquisa bem como estabelecer as características químicas mais importantes da molécula que promovem e/ou estabilizam tal interação (Fig. 15L). Tal investigação se deu através de métodos computacionais descritos na seção de materiais e métodos, item 4.8. Findando esta etapa, busca-se averiguar o comportamento do derivado de carbazoles selecionado em ensaios de longa duração, os quais representam uma maior proximidade com a realidade clínica (Fig. 15M). Neste momento, conhecer a evolução da capacidade inibitória do composto (Fig. 15N), através do método de citometria de fluxo, e investigar sua capacidade de reverter o fenótipo de resistência mediado pelo transportador ABCG2 (Fig. 15O), através do método de MTT, ambos em função do tempo, introduzem a determinação da aplicabilidade clínica do composto em estudo.

FIGURA 15 - FLUXOGRAMA DE TRABALHO

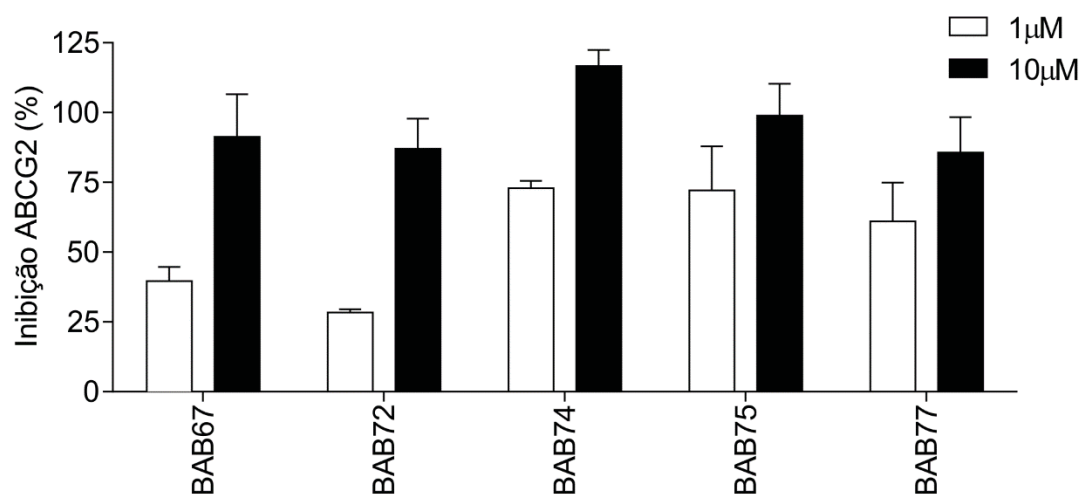


Fonte: O Autor (2019)

5.1 AVALIAÇÃO DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES COMO INIBIDORES DO TRANSPORTADOR ABCG2

Para avaliar a capacidade dos derivados de carbazoles em inibir o transporte de substratos mediado pelo transportador ABCG2, utilizou-se um quimioterápico fluorescente (mitoxantrona) transportado pela referida proteína e compatível com o conjunto de lasers e filtros presentes no citômetro de fluxo FACS Calibur. Os níveis intracelulares de mitoxantrona foram monitorados por citometria de fluxo utilizando o canal FL4-H em células da linhagem HEK293 transfectadas de maneira estável para superexpressar o transportador ABCG2 (células HEK293-ABCG2). Observou-se que todos os compostos foram capazes de inibir o transporte de mitoxantrona mediado pelo transportador ABCG2 (Fig. 15). Contudo, os resultados de inibição do transportador ABCG2 demonstram que a concentração de 1 μM não produziu um efeito máximo de inibição, diferentemente da concentração de 10 μM , que promoveu uma inibição de 100% do transporte de mitoxantrona mediado pelo transportador ABCG2 (Fig. 16).

FIGURA 16 - INIBIÇÃO DO EFLUXO DE MITOXANTRONA MEDIADO PELO TRANSPORTADOR ABCG2 REALIZADO PELOS DERIVADOS DE CARBAZOLES EM ESTUDO



FONTE: O Autor (2019)

NOTA: Células HEK293-ABCG2 foram expostas à mitoxantrona (5 μM) e derivados de carbazoles (1 e 10 μM). A porcentagem de inibição foi determinada usando o Ko143 (0,5 μM) como referencial de 100% de inibição. Um controle paralelo com células HEK293 *wild-type* também foi realizado. Os valores foram obtidos a partir da determinação do acúmulo intracelular de mitoxantrona por citometria de fluxo como descrito na seção de materiais e métodos item 4.4. Os resultados foram expressos como percentuais de inibição em relação ao controle com Ko143 e representam a média ± DP de três experimentos independentes.

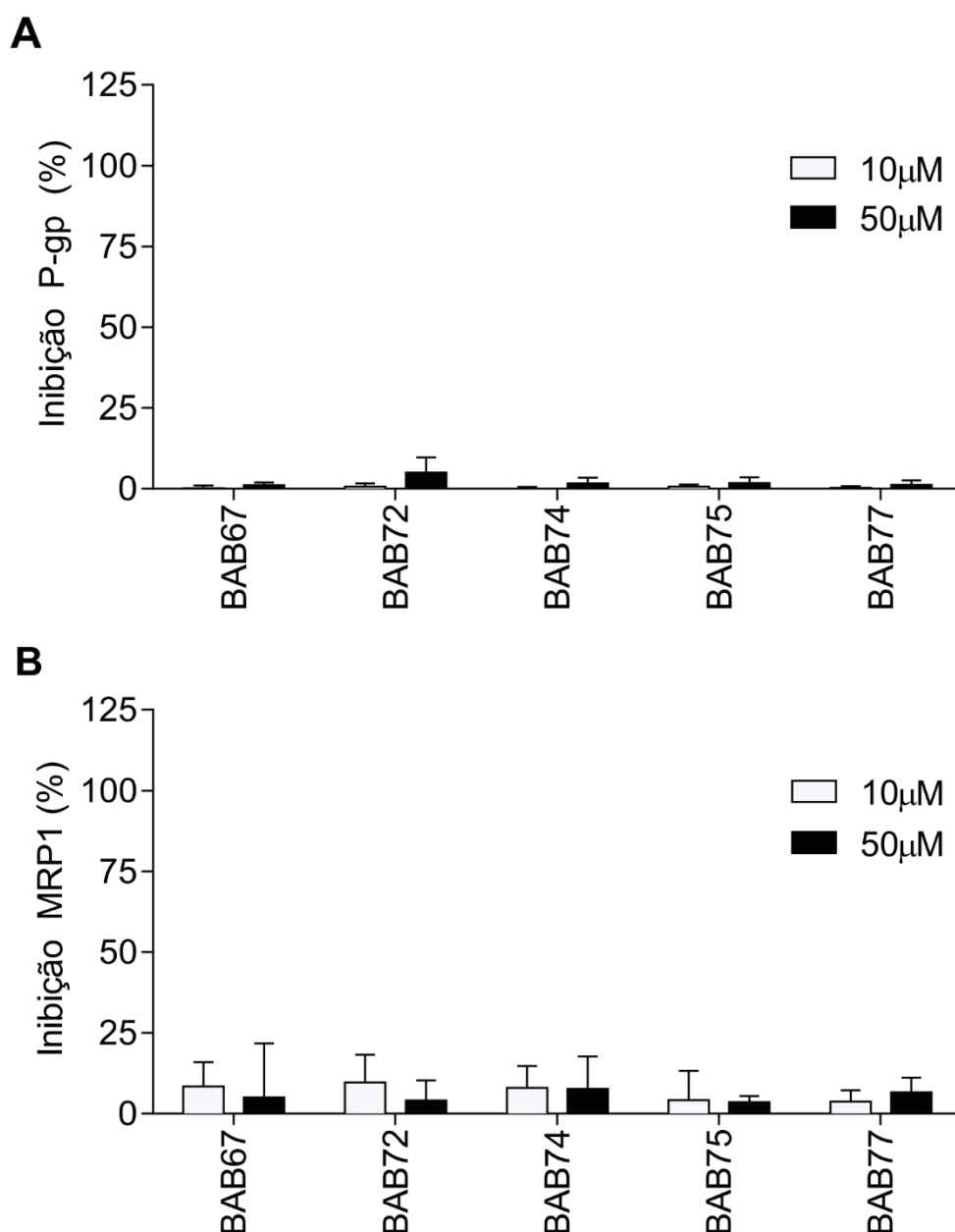
Os inibidores do transportador ABCG2 podem ser divididos em duas classes: completos ou incompletos. A classe de inibidores incompletos compreende compostos que inibem parcialmente o transportador, não sendo capazes de produzir efeito inibitório de 100% mesmo quando em concentrações saturantes. Dentre os membros desta classe, destacam-se a 6-prenilcrisina (AHMED-BELKACEM et al., 2005), algumas chalconas (VALDAMERI et al., 2012) e os estilbenos (VALDAMERI et al., 2011), os quais saturam seu efeito entre 50 a 75% da inibição máxima. Os compostos pertencentes à classe de inibidores completos, por sua vez, são capazes de produzir efeito inibitório de 100% e, portanto, bloqueiam totalmente o transporte de quimioterápicos mediado por ABCG2. Destacam-se nesta classe o Ko143 (AMBUDKAR et al., 2015), a cromona – MBL-II-141 (PAYEN et al., 2014; VALDAMERI; GENOUX; PERES, 2012) e derivados de indeno-indoles (GOZZI et al., 2015).

Dentre todas as substâncias pertencentes às duas classes supracitadas, os inibidores completos de ABCG2 são considerados os compostos mais elegíveis à realização de futuros testes *in vivo*. Uma vez que os derivados dos carbazoles mostraram-se capazes de inibir 100% do transporte de quimioterápicos mediados por ABCG2 (Fig. 15), os mesmos se enquadram na classe de inibidores completos e, desta forma, são considerados candidatos promissores para estudos de atividade biológica desta natureza.

5.2 AVALIAÇÃO DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES EM ESTUDO COMO INIBIDORES SELETIVOS DO TRANSPORTADOR ABCG2

Para avaliar o grau de seletividade dos derivados de carbazoles em inibir o transportador ABCG2, foi realizado o mesmo ensaio de inibição descrito anteriormente, porém em células que expressam os transportadores P-gp e MRP1. O transporte dos substratos de P-gp e MRP1, rhodamina 123 e calceína-AM, respectivamente, foram monitorados na presença dos derivados de carbazoles nas concentrações de 10 e 50 μM . Os modelos celulares utilizados foram células das linhagens NIH3T3 transfectadas de maneira estável para superexpressar P-gp (células NIH3T3-*ABCB1*) e células da linhagem BHK21 transfectadas de maneira estável para superexpressar MRP1 (células BHK21-*ABCC1*). Observou-se que todos os compostos, mesmo sob concentrações consideravelmente elevadas (cinco vezes superior ao avaliado para ABCG2), não foram capazes de inibir significativamente o transporte dos substratos supracitados pela P-gp e MRP1, apresentando-se, portanto, seletivos para ABCG2 (Fig. 16).

FIGURA 17 - AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES EM ESTUDO PARA INIBIR O TRANSPORTADOR ABCG2



FONTE: O Autor (2019).

NOTA: (A) Células NIH3T3-*ABCB1* foram expostas à rhodamina 123 (5 μM) e derivados de carbazoles (10 e 50 μM). A porcentagem de inibição foi determinada usando o elacridar (GF120918) (0,5 μM) como referencial de 100% de inibição. (B) Células BHK21-*ABCC1* foram expostas à calceína-AM (0,01 μM) e derivados de carbazoles (10 e 50 μM). A porcentagem de inibição foi determinada utilizando o verapamil (30 μM) como referencial de 100% de inibição. Controles adicionais foram realizados com as linhagens que não expressam os referidos transportadores (NIH3T3 e BHK21 *wild type*) em ambos os experimentos. Os valores foram obtidos a partir da determinação do acúmulo intracelular de rhodamina 123 (A) e calceína-AM (B) por citometria de fluxo como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.4. Em ambos os casos, os resultados foram expressos como percentuais de inibição em relação aos controles e representam a média ± DP de três experimentos independentes.

A verificação de um perfil seletivo na inibição é um fator desejável e crítico na identificação de novos inibidores do transportador ABCG2. Os inibidores de ABCG2 também são classificados pela literatura, considerando este importante aspecto, em dois grupos distintos: inibidores seletivos e inibidores não seletivos.

Os casos mais comumente observados de inibidores não seletivos compreendem compostos que apresentam potencial inibitório frente aos transportadores ABCG2 e P-gp, dos quais se destacam o Ko143 e o elacridar. Compostos pertencentes à esta classe podem apresentar potenciais inibitórios distintos para os transportadores os quais são capazes de inibir e, desta forma, podem mostrar-se mais seletivos para um transportador dentre os demais. Exemplificando o caso supracitado, o Ko143 e o Nilotinib apresentam-se mais seletivos para ABCG2 quando comparados seus perfis inibitórios para ABCG2 e P-gp (AMBUDKAR et al., 2015; BRENDEL et al., 2007). De maneira inversa, o Elacridar e o Tariquidar, considerados dois dos mais potentes inibidores não seletivos de ABCG2 e P-gp, possuem uma maior seletividade para P-gp (PENA-SOLORZANO et al., 2016). Outra informação acerca dos transportadores não seletivos que merece menção corresponde ao fato de que, em diferentes concentrações, os compostos têm seus perfis inibitórios alterados. O Tariquidar, quando em baixas concentrações, atua como inibidor seletivo para P-gp e como substrato para ABCG2; em elevadas concentrações, atua como inibidor não seletivo para ABCG2 e P-gp com preferência (menor valor de IC_{50}) para a P-gp (PUENTES et al., 2011). A não seletividade de um composto representa desafios adicionais quando o mesmo é submetido à estudos *in vivo*, uma vez que seu perfil seletivo sofre influência direta tanto das concentrações de inibidor empregadas quanto dos níveis de expressão dos transportadores-alvo (KANNAN et al., 2011). Casos de inibidores não seletivos capazes de inibir os três transportadores ABC (ABCG2, P-gp e MRP1) são raramente encontrados na literatura e possuem como principal representante a curcumina (CHEARWAE, 2006).

A quantidade de inibidores descritos como potentes e seletivos para o transportador ABCG2, representados pelas cromonas (PIRES et al., 2016; VALDAMERI; GENOUX; PERES, 2012), ainda é consideravelmente reduzida, tornando ainda mais almejada a identificação de inibidores que apresentem tais

características. Os resultados apresentados nas figuras 15 e 16 demonstram claramente que os derivados de carbazoles são altamente promissores pois são completamente seletivos para o transportador ABCG2.

5.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR ABCG2 (IC_{50}) E CITOTOXICIDADE (IG_{50}) DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES EM ESTUDO

Uma vez comprovada uma das principais características que devem ser apresentadas por compostos durante o desenvolvimento de novos inibidores dos transportadores ABC, apresentar seletividade para o transportador alvo, mostrou-se lógica e necessária a determinação dos valores de IC_{50} de inibição (concentração necessária para obter 50% da inibição máxima) e IG_{50} (concentração necessária para obter 50% de redução na quantidade de células viáveis) dos compostos. Seguindo o fluxo padrão de desenvolvimento e caracterização de inibidores, o objetivo desta próxima etapa consistiu em avaliar outras duas características importantes nos compostos em estudo: (i) afinidade pelo transportador (valores de IC_{50}) e (ii) citotoxicidade (valores de IG_{50}).

Com o intuito de avaliar a potência de inibição (medida indireta de afinidade) dos derivados de carbazoles enquanto inibidores do transportador ABCG2 e compará-los entre si, foram determinados os valores de IC_{50} de inibição do efluxo de mitoxantrona para cada composto. O modelo utilizado, análogo ao que foi utilizado para avaliar a inibição dos compostos frente ao transportador ABCG2, compunha-se por células da linhagem HEK293-ABCG2. É possível verificar, tanto na figura 17A quanto na tabela 2, que três compostos destacaram-se por apresentar valores de IC_{50} inferiores à 1 μ M, sendo que o composto BAB75 mostrou-se o mais potente da série, com um valor de IC_{50} de 0,49 μ M.

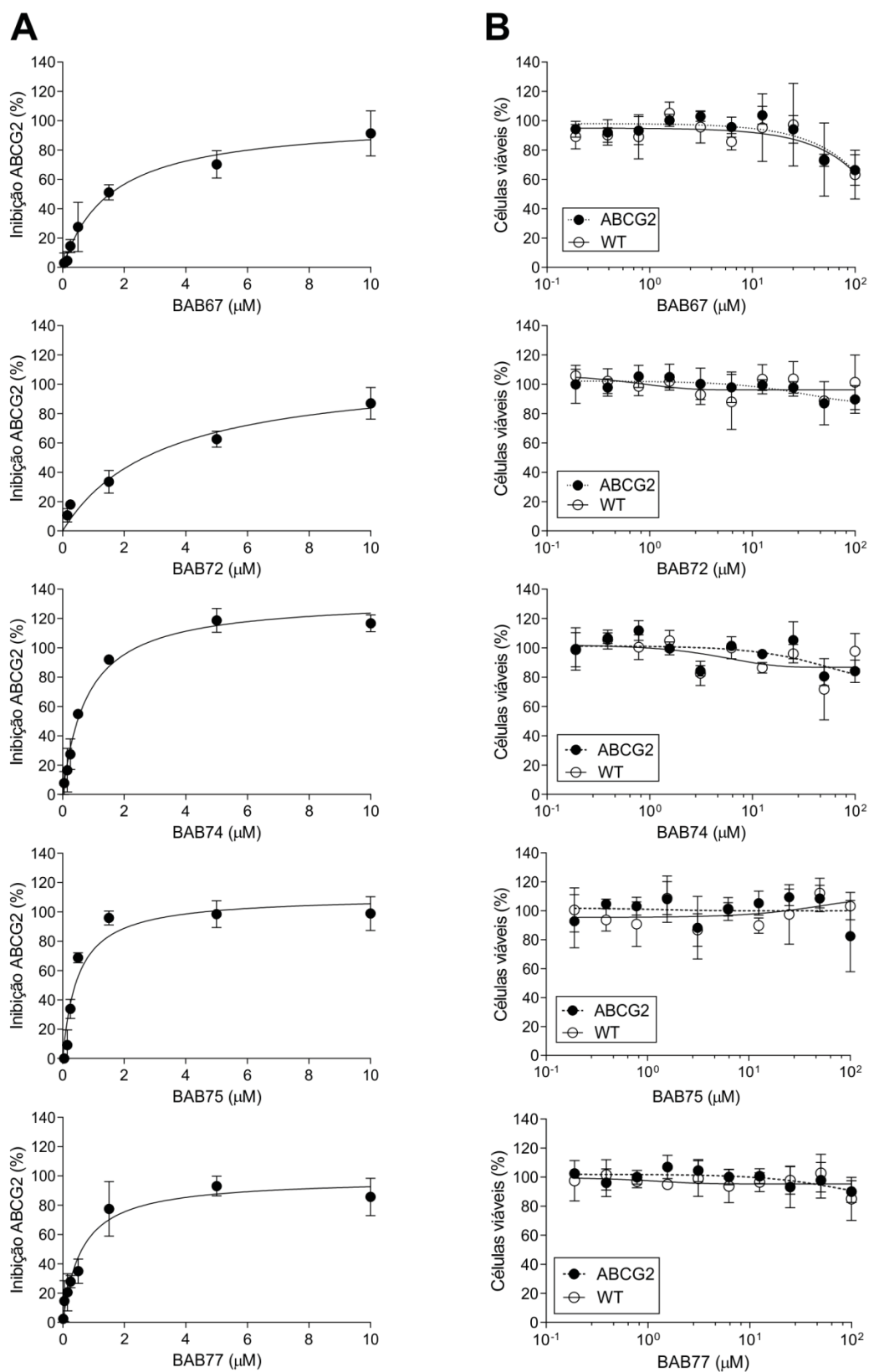
Para avaliação do perfil citotóxico dos compostos, foram utilizadas células HEK293-ABCG2 e células controle HEK293 *wild type* (linhagem “selvagem”, não transfectada para superexpressar o transportador). Ambas linhagens celulares foram expostas aos derivados de carbazoles (0,39 – 100

μM) por 72h. Após este período de tratamento, foi realizado um ensaio de viabilidade celular. Este ensaio permitiu duas importantes verificações: (i) determinar os valores de IG_{50} dos derivados de carbazoles e (ii) avaliar a possibilidade de um quadro de *crossresistance*.

O fenômeno de *crossresistance* ocorre quando o transportador ABCG2 demonstra-se capaz de realizar o efluxo do composto submetido ao teste, neste caso um inibidor. No caso de um composto transportado, índices mais elevados de citotoxicidade são observados nas células *wild type* devido a um maior acúmulo intracelular da substância. Como mostrado na figura 17B, os compostos não apresentaram citotoxicidade mesmo nas maiores concentrações avaliadas. A ausência de citotoxicidade é positiva para aplicação do inibidor em futuros testes pré-clínicos, mas inviabiliza a determinação do efluxo por métodos de viabilidade celular.

Dentre os derivados, o BAB67 parece ser o mais citotóxico, reduzindo a viabilidade celular em aproximadamente 30% na concentração de 100 μM . Como esta redução na viabilidade foi similar em ambas as linhagens celulares, o resultado sugere que os derivados de carbazoles testados não são transportados por ABCG2 (Fig. 17B). Todavia, como mencionado anteriormente, para esta afirmação é necessário o desenvolvimento de um ensaio analítico para quantificar os derivados de carbazoles em um modelo celular.

FIGURA 18 - AFINIDADE E CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES FRENTE AO TRANSPORTADOR ABCG2



FONTE: O Autor (2019).

NOTA: (A) Células HEK293-ABCG2 foram expostas à mitoxantrona (5 μ M) e concentrações crescentes dos derivados de carbazoles (0,015 - 10 μ M). A porcentagem de inibição foi determinada usando o Ko143 (0,5 μ M) como referencial de 100% de inibição. Um controle paralelo com células HEK293 *wild type* também foi realizado. Os valores foram obtidos a partir da determinação do acúmulo intracelular de mitoxantrona por citometria de fluxo como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.4. Os resultados foram expressos como percentuais de inibição em relação ao controle com Ko143 e representam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes e as curvas para determinar os valores de IC₅₀ de inibição do transporte de mitoxantrona mediado pelo transportador ABCG2 foram construídas usando o programa GraphPad Prism 5. (B) Células HEK293-ABCG2 e HEK293 *wild type* foram expostas à concentrações crescentes dos derivados de carbazoles (0,39 - 100 μ M) por 72 h. O percentual de células viáveis foi determinado utilizando controles tratados apenas com DMSO. Os valores foram obtidos aplicando o método de MTT, como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.5. Os resultados foram expressos como percentual de células viáveis em relação ao controle e representam a média $\pm$ DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

A verificação de ausência de transporte, ou seja, incapacidade do transportador de realizar o efluxo de seu inibidor, é desejável pois viabiliza o uso do composto por longos períodos de tratamento, fato imprescindível para a sua aplicação clínica. A maioria dos inibidores de ABCG2 descritos na literatura não é transportada por ABCG2 e os compostos que apresentam comportamento oposto costumam ter seus estudos descontinuados. O Nilotinib, um medicamento aprovado pelo FDA como inibidor de tirosina quinase que adicionalmente se mostrou um potente inibidor de ABCG2 com real possibilidade de ser submetido à testes clínicos, é transportado por ABCG2, o que inviabilizou sua utilização clínica enquanto inibidor do transportador (DOHSE et al., 2010; EADIE; HUGHES; WHITE, 2014).

Os índices de citotoxicidade juntamente com os índices de eficácia inibitória de ABCG2 nos permitem determinar um quociente (IG₅₀/IC₅₀), denominada razão terapêutica (RT), um importante parâmetro a ser considerado durante o processo de identificação de novos inibidores potentes e menos citotóxicos, duas características essenciais para futuros candidatos à ensaios *in vivo* (VALDAMERI et al., 2012). Por não ter sido possível determinar os valores de IG₅₀ dos derivados de carbazoles (Fig. 17B), aspecto positivo quanto à sua baixíssima citotoxicidade, a determinação da razão terapêutica foi determinada considerando valores superiores à 100 μ M (Tabela 3). O composto mais promissor da série se deu pela análise comparativa dos valores de RT de cada substância, considerando majoritariamente a potência de inibição. Portanto, o composto que destacou-se e foi submetido à testes de

caracterização molecular foi o BAB75, que apresentou um valor de RT superior a 200 (Tabela 3).

TABELA 3 - VALORES DE IC₅₀, IG₅₀ E RAZÃO TERAPÊUTICA DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES

Compostos	IC₅₀±DP Inibição (μM)	IG₅₀ Citotoxicidade (μM)	Razão Terapêutica (IG₅₀ / IC₅₀)
BAB67	1,55±0,42	>100	>65
BAB72	3,39±1,42	>100	>29
BAB74	0,80±0,12	>100	>125
BAB75	0,49±0,20	>100	>204
BAB77	0,60±0,14	>100	>167

FONTE: O Autor, 2019.

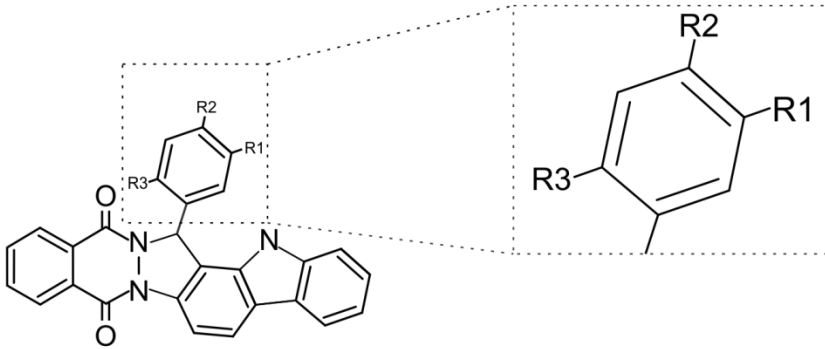
Majoritariamente, os trabalhos que reportam a identificação e caracterização de inibidores de transportadores ABC não consideram os índices de citotoxicidade destes compostos, prejudicando o avanço dos mesmos quando conduzidos para a etapa de testes pré-clínicos do desenvolvimento de fármacos. Poucos inibidores de ABCG2 apresentam uma razão terapêutica superior a 200. O Ko143, inibidor de referência do transportador ABCG2, possui valores estimados de RT entre 300 e 400 (VALDAMERI; GENOUX; PERES, 2012) e as chalconas, classe de substâncias que apresenta diversos compostos com potenciais inibitórios promissores frente ao ABCG2, possuem poucos representantes que apresentam valores superiores a 100 (VALDAMERI et al., 2012). O fato dos derivados de carbazoles testados neste trabalho apresentarem valores de IC₅₀ inferiores a 1 μM e ausência de citotoxicidade em doses 100 vezes superiores aos seus valores de IC₅₀ demonstram claramente o potencial que estes compostos apresentam para serem testados em ensaios pré-clínicos.

5.4 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES EM ESTUDO COMO INIBIDORES DE ABCG2

Os cinco derivados de carbazoles testados neste estudo apresentam variações de três grupos substituintes em suas estruturas: metoxi (OMe), aquila (CH₃) e halogêneo (Cl). Os dados de potencial inibitório obtidos através dos valores de IC₅₀ (Tabela 2) permitem o estabelecimento de alguns conceitos iniciais quanto à estrutura-atividade destes compostos.

No quadro 5 estão representadas as estruturas dos derivados de carbazoles avaliados, bem como o percentual de inibição do transportador ABCG2 (1 e 10 µM), os valores de IC₅₀ e I_{MÁX} obtidos para cada derivado. Também encontram-se destacados e ampliados o anel benzênico que sofre as referidas variações de substituintes e suas posições onde as mesmas ocorrem, denominadas R1, R2 e R3.

QUADRO 5 - ANÁLISE DE ESTRUTURA-ATIVIDADE DOS DERIVADOS DE CARBAZOLES

							
Compostos	R1	R2	R3	Inibição de ABCG2 (%)		I _{c₅₀} ±DP (μM)	I _{máx} ±DP (μM)
				1 μM	10 μM		
BAB67	-	-	-	39,60	91,35	1,55±0,42	100,50±8,50
BAB72	OMe	-	-	28,40	87,04	3,39±1,42	112,60±17,81
BAB74	CH ₃	-	-	72,97	116,71	0,80±0,12	133,60±5,73
BAB75	-	Cl	-	72,13	98,87	0,49±0,20	110,80±6,80
BAB77	-	-	CH ₃	61,07	85,66	0,60±0,14	98,18±6,89

FONTE: O Autor (2019).

Os compostos podem ser classificados em inibidores completos e incompletos com base nos seus valores de I_{MÁX}, os quais correspondem aos valores máximos de inibição do transportador ABCG2 expressos como percentual de inibição em relação ao controle (Ko143 à 0,5 μM). Inibidores incompletos apresentam I_{MÁX} ≤ 80% e inibidores completos apresentam I_{MÁX} ≥ 80%. Como é possível observar no quadro 5, todos os derivados de carbazoles testados apresentaram valores de I_{MÁX} maiores que 80%, o que os caracteriza como inibidores completos.

No que diz respeito a presença de substituintes, pode-se observar que a presença de um grupo metoxi é negativa para o potencial inibitório do composto, enquanto que a presença de um grupo metil ou cloro é positiva. A potência inibitória (IC_{50}) dos compostos testados ordena-se de maneira decrescente, com base em suas substituições estruturais, conforme o seguinte racional: halogênios > alquila > sem substituição > metoxi. Por ser um pequeno grupo de moléculas, torna-se difícil tirar conclusões mais precisas acerca dos substituintes. Contudo, comparando as informações descritas neste estudo com a literatura, observamos um efeito discordante, uma vez que normalmente a adição de grupos metoxi é positiva para o potencial inibitório dos compostos (VALDAMERI et al., 2011, 2012). A presença de halogênios pode apresentar efeitos tanto negativos (VALDAMERI et al., 2012) quanto positivos (VALDAMERI; GENOUX; PERES, 2012) na inibição do transportador ABCG2. Em geral, a presença e posição dos substituintes pode afetar consideravelmente o potencial de inibição.

Em relação à quantidade de substituintes, não é possível estabelecer relações mais acuradas uma vez que apenas uma substituição foi realizada para a síntese dos derivados de carbazoles testados. Porém, pode-se considerar o fato de que, na maioria dos casos, uma substituição representou uma contribuição positiva na eficácia inibitória dos compostos em questão.

No que tange as posições onde as substituições ocorreram, uma relação interessante pode ser estabelecida entre os compostos BAB74 e BAB77, ambos substituídos por um grupo alquila porém em posições diferentes no anel benzênico. O composto BAB77 apresentou um melhor potencial inibitório que o BAB74 (IC_{50} 0,6 vs 0,8, respectivamente).

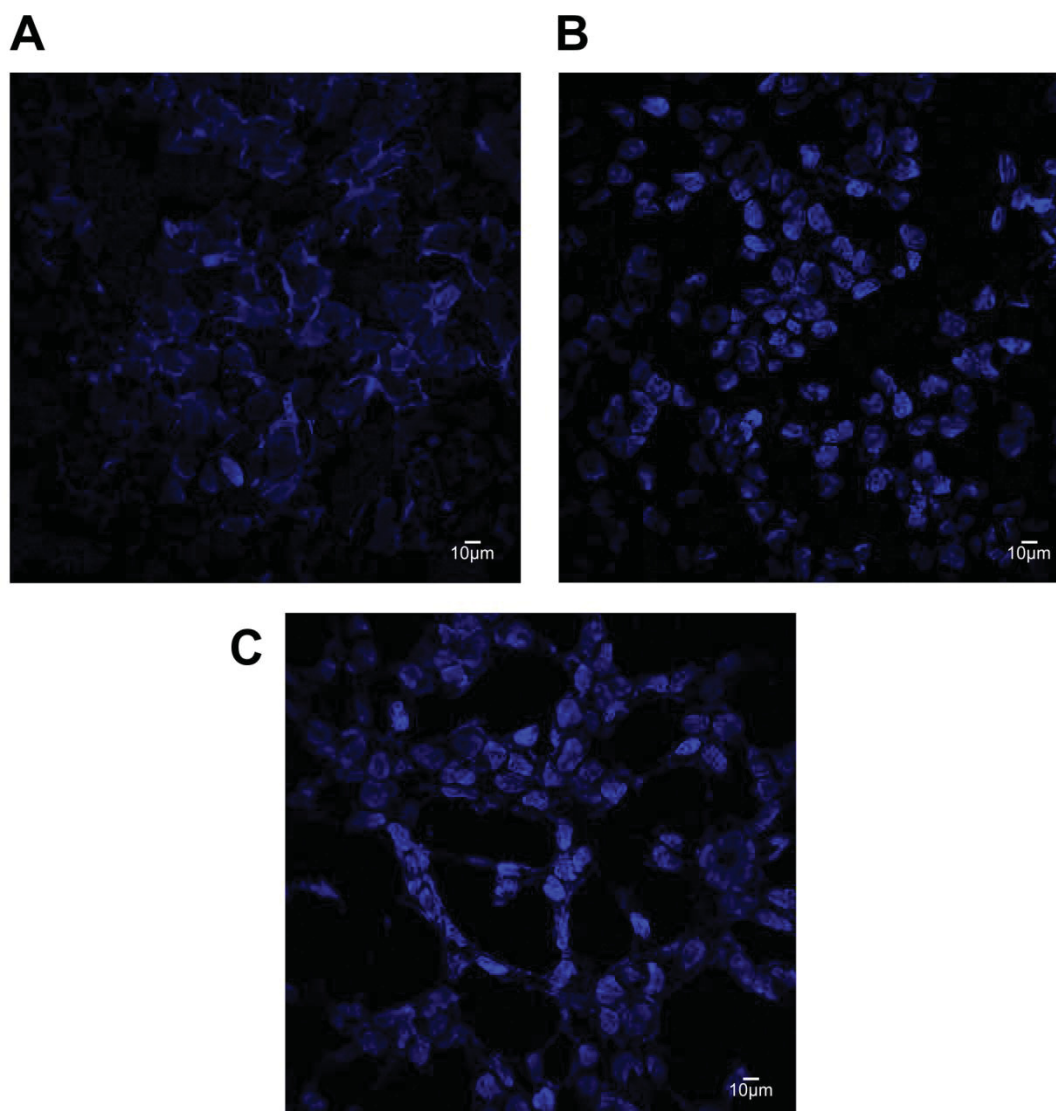
5.5 CONFIRMAÇÃO DA INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR ABCG2 UTILIZANDO SUBSTRATO ALTERNATIVO

Todos os dados de inibição do transportador ABCG2 apresentados neste trabalho foram obtidos a partir de experimentos (descritos no item 4.4) nos quais a mitoxantrona foi empregada como substrato, agente quimioterápico com perfil fluorescente. Apesar da mitoxantrona ser considerada o substrato de

primeira escolha para seleção de novos inibidores do referido transportador, é desejável avaliar se novos inibidores confirmam seu efeito frente a outros substratos. Com o intuito de confirmar se o derivado de carbazoles mais promissor, o BAB75 é capaz de bloquear o efluxo de diferentes substratos mediado pelo transportador ABCG2, sua capacidade de promover inibição foi testada frente a outro substrato do transportador ABCG2, o Hoechst 33342. Este substrato de ABCG2 é capaz de permear membranas celulares e ligar-se à moléculas de DNA (CURRAN et al., 2015). Seus espectros de excitação e emissão impedem o uso de citômetros de fluxo que não sejam equipados com laser do tipo UV e, por esta razão, o ensaio de inibição foi realizado segundo o método de microscopia confocal. Como pode ser evidenciado nas imagens da figura 18, o BAB75 (Fig. 18C) inibiu o efluxo do Hoechst 33342 com a mesma eficiência que o inibidor de referência Ko143 (Fig. 18B), confirmando a capacidade do composto de inibir o transporte mediado por ABCG2 de diversos substratos e, positivamente, não se tratar de uma composto com capacidade inibitória do tipo substrato-específico.

Devido à habilidade de permear as membranas celulares e ligar-se à moléculas de DNA, a acumulação intracelular do Hoechst 33342 é comumente observada na região nuclear, onde verifica-se uma maior intensidade de fluorescência. Em células que expressam ABCG2, o substrato não é capaz de acumular-se na região do núcleo pois é continuamente transportado pela referida proteína. O controle negativo (Fig. 18A) representa células HEK293-ABCG2 em contato com Hoechst 33342 sem nenhum tipo de inibição aplicado, o que justifica seus núcleos apresentarem uma menor intensidade de fluorescência quando comparados com os meios citoplasmático e extracelular. A inibição exercida pelo inibidor de referência Ko143 (Fig. 18B) e pelo BAB75 (Fig. 18C) demonstram o bloqueio da atividade de transporte do Hoechst 33342 mediada pelo transportador ABCG2 e, desta forma, justificam a visualização de uma maior intensidade de fluorescência nas regiões nucleares, em ambas as imagens.

FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DO BAB75 FRENTE AO TRANSPORTADOR ABCG2 UTILIZANDO HOECHST 33342 COMO SUBSTRATO



FONTE: O Autor (2019).

NOTA: Células HEK293-ABCG2 foram expostas ao substrato fluorescente Hoechst 33342 (1 μ M) e ao BAB 75 em concentração saturante (10 μ M) (C). Controles positivo e negativo de inibição do transporte do substrato mediado por ABCG2 foram realizados utilizando o inibidor de referência Ko143 (0,5 μ M) (B) e ausência de inibidores (A), respectivamente. As imagens foram obtidas através do método de microscopia confocal, descrito na seção de Materiais e Métodos, item 4.7.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DO BAB75 FRENTE AO TRANSPORTADOR ABCG2

Para explorar o mecanismo de inibição do transportador ABCG2 promovido pelo derivado de carbazoles BAB75, foi realizada uma curva de

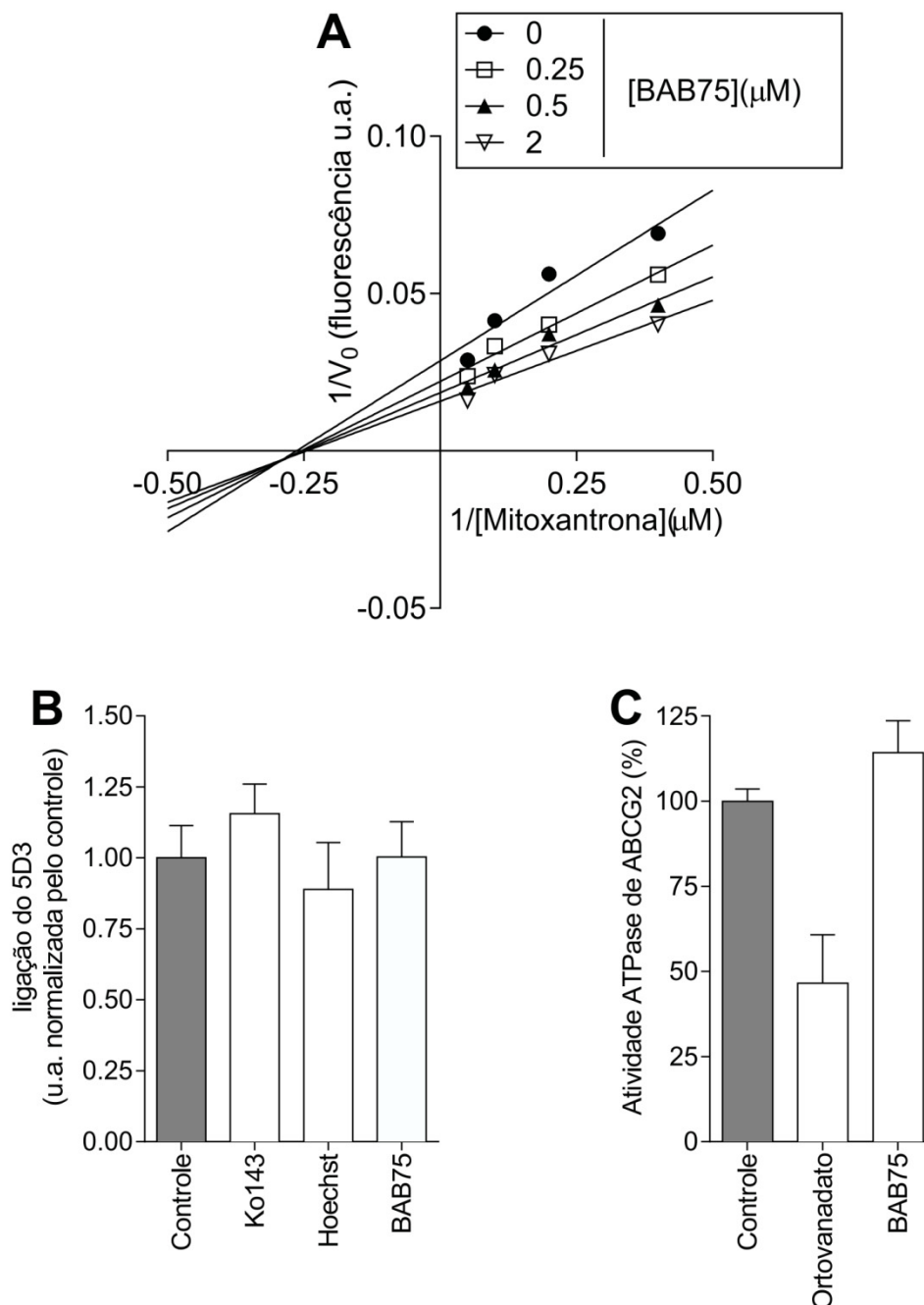
fluorescência por concentração de substrato em várias concentrações do inibidor (BAB75) e substrato (mitoxantrona). As curvas foram linearizadas pelo método de Lineweaver-Burk (gráfico duplo recíproco) para obtenção dos parâmetros cinéticos $V_{\max}$ e K_m para cada concentração de inibidor. De acordo com este tipo de análise 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 porque $V_{\max}$ está diminuindo (Fig. 19A). Este resultado está de acordo com a literatura, que descreve os inibidores de ABCG2 como não competitivos, a citar os estilbenos, elacridar e cromonas (VALDAMERI et al., 2011; VALDAMERI; GENOUX; PERES, 2012) e também corrobora com a capacidade de inibição do transporte de diferentes substratos promovida pelo BAB75, comprovada no item 5.5, sugerindo que o BAB75 se liga em um sítio diferente do sítio de transporte do transportador ABCG2.

ABCG2 possui um *loop* extracelular denominado ECL3, que é reconhecido pelo anticorpo 5D3. Esse anticorpo é descrito como um anticorpo conformacional e amplamente utilizado para caracterização de ligantes em ABCG2. O efeito da ligação do anticorpo 5D3 foi testado após incubação das células HEK293-ABCG2 com o derivado de carbazoles BAB75. A figura 19B demonstra que o BAB75 não interfere no reconhecimento do anticorpo conformacional pelo transportador ABCG2. A literatura sugere que substratos normalmente diminuam o reconhecimento do anticorpo 5D3 e que inibidores aumentam este reconhecimento, devido às mudanças conformacionais induzidas durante estas interações. Como pode ser evidenciado na figura 19b, apesar de efeitos discretos, o substrato Hoechst 33342 e o inibidor Ko143 confirmam este fenômeno. Este resultado sugere que o BAB75 se liga no transportador ABCG2 em um sítio diferente ao do Ko143, uma vez que as alterações alostéricas induzidas parecem ser diferentes, quando considerado exclusivamente o reconhecimento do *loop* ECL3 do transportador ABCG2 pelo anticorpo conformacional 5D3.

Outra forma de explorar o mecanismo de inibição do transportador ABCG2 é avaliar o efeito dos inibidores sobre a atividade ATPase. Para avaliar o efeito do BAB75 sobre a atividade ATPase do transportador ABCG2 foram utilizados extratos protéicos provenientes de células HEK293-ABCG2. O

ortovanadato de sódio é um conhecido inibidor da atividade ATPase dos transportadores ABC e, por esta razão, é utilizado como controle positivo nestes ensaios. Como é possível observar na figura 19C, o derivado de carbazoles BAB75 não interferiu na atividade ATPase do transportador ABCG2, diferentemente do ortovanadato de sódio, que como esperado inibiu a atividade ATPase da referida proteína.

FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR ABCG2 PROMOVIDO PELO BAB75



FONTE: O Autor (2019).

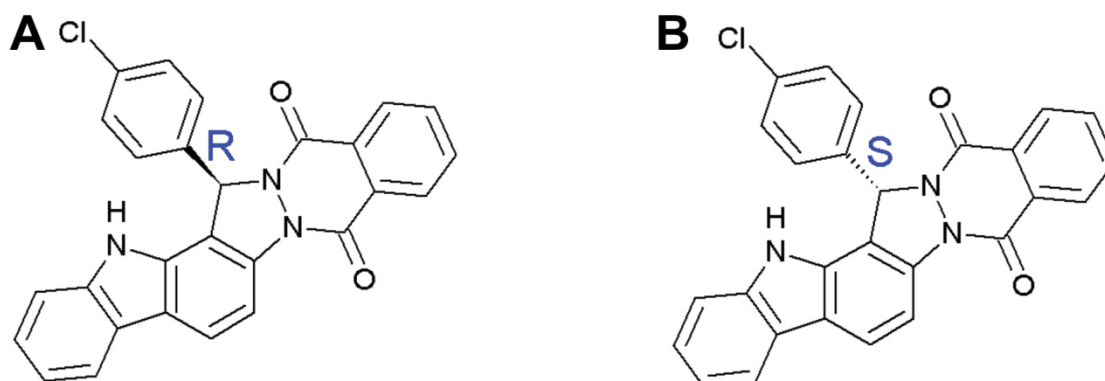
NOTA: (A) Células HEK293-ABCG2 foram expostas às concentrações crescentes de mitoxantrona (2,5 – 20 μM) e do BAB75 (0,25 – 2 μM). Um controle de inibição foi realizado utilizando o Ko143 (0,5 μM) como referencial de 100% de inibição. Um controle paralelo com células HEK293 *wild type* também foi realizado. Os valores foram obtidos a partir da determinação do acúmulo intracelular de mitoxantrona por citometria de fluxo como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.4. Os dados foram linearizados conforme o método de

Lineweaver-Burk para que fossem apresentados em um gráfico do tipo duplo recíproco e os resultados, expressos como unidades arbitrárias de fluorescência normalizadas pelo controle, representam a média $\pm$ DP de dois experimentos independentes (B) Células HEK293-ABCG2 foram expostas à concentração saturante do BAB75 (10 μ M) e incubadas com anticorpos (5D3 e secundário conjugado com PE) como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.9. Controles positivo e negativo foram realizados utilizando o inibidor de referência Ko143 à 1 μ M e o substrato fluorescente Hoechst 33342 à 1 μ M, respectivamente. Os valores foram obtidos a partir da quantificação de peroxidase por citometria de fluxo como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.4 Os resultados, expressos como unidades arbitrárias de fluorescência normalizadas pelo controle, representam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes. (C) Células HEK293-ABCG2 foram expostas à concentração saturante do BAB75 (10 μ M) e incubadas com ATP (4 mM) e reagente Verde de Malaquita como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.8. Controles positivo e negativo foram realizados utilizando o inibidor Ortovanadato à 6 mM e ausência de inibidores, respectivamente. Os valores foram obtidos a partir do método de avaliação da atividade ATPase, como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.8. Os resultados foram expressos como percentual de inibição em relação ao controle positivo e representam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

5.7 IDENTIFICAÇÃO DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DO BAB75 NO TRANSPORTADOR ABCG2

Todos os compostos testados nesta série possuem um carbono quiral, mostrando que os testes foram conduzidos a partir da mistura racêmica dos isômeros R e S. O docking molecular foi conduzido com o intuito de responder duas perguntas: qual a região de ligação do inibidor à proteína e se havia diferença na interação dos isômeros no transportador ABCG2, ou seja, se a participação dos dois isômeros na inibição era equivalente ou não. A figura 21A e B mostra o carbono quiral e a ligação que difere entre eles na estrutura do BAB 75.

FIGURA 21 - ISOMERIA ESPACIAL DO BAB75



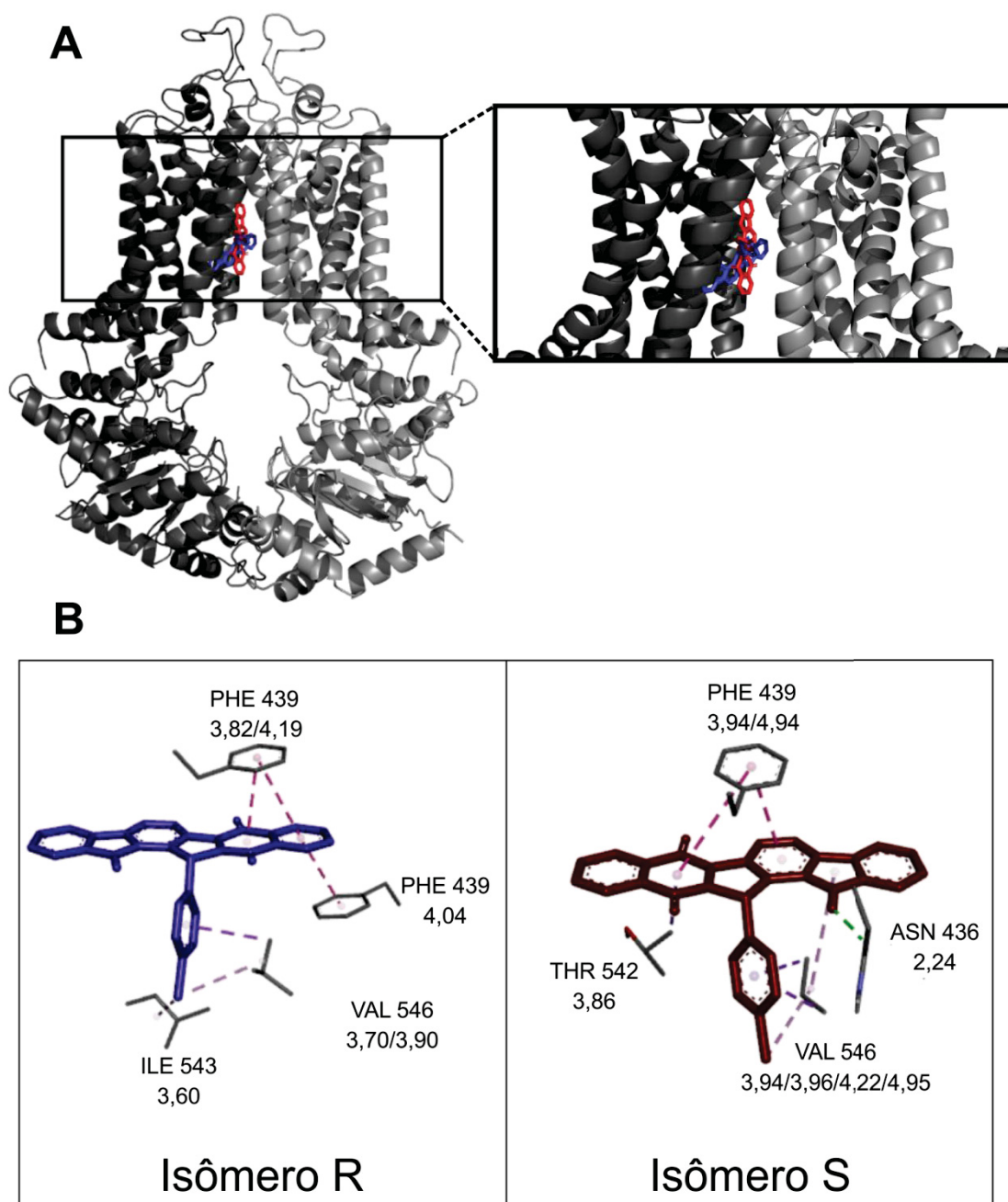
FONTE: O Autor (2019).

NOTA: Isômeros R (A) e S (B) do derivado de carbazoles BAB75.

A análise das energias de ligação do docking molecular mostrou que o BAB75 (isômero R) ligou-se com energia de -13,9 Kcal/mol enquanto que o BAB75 (isômero S) ligou-se com energia de -13,5 Kcal/mol. A diferença entre as energias de ligação é muito pequena entre os dois isômeros mostrando que ambos parecem ter a mesma participação na inibição do transportador ABCG2 e que nenhuma das estruturas mostrou ligação energeticamente mais favorável que a outra. Esta análise sugere a inexistência de preferência do transportador ABCG2 para a ligação dos enantiômeros de BAB75.

Por fim, o próximo passo foi definir a região de ligação do BAB75 no transportador ABCG2. Como esperado, ambos os enantiômeros do inibidor se ligam na cavidade 1, localizada na região transmembrana mais hidrofóbica do transportador ABCG2, porém diferem na proximidade de certos resíduos de aminoácidos. Avaliando-se apenas a conformação menos energética do composto é notável que o isômero R faz interações hidrofóbicas com os aminoácidos PHE 439, VAL 546 e ILE 543 enquanto que o isômero S faz interações hidrofóbicas com PHE 439, THR 542, VAL 546 além de apresentar uma ponte de hidrogênio com o resíduo ASN 436. É importante notar que as pontes de hidrogênio aparecem com mais frequência na interação com o isômero S e em conformações menos energéticas, no isômero R esse tipo de interação só aparece em conformações de maior energia. Dessa forma, os isômeros parecem compartilhar a ligação em alguns resíduos de aminoácidos e ligam-se a regiões próximas porém diferentes do transportador ABCG2.

FIGURA 22 - DOCKING MOLECULAR DO BAB75 NO TRANSPORTADOR ABCG2



FONTE: O Autor (2019).

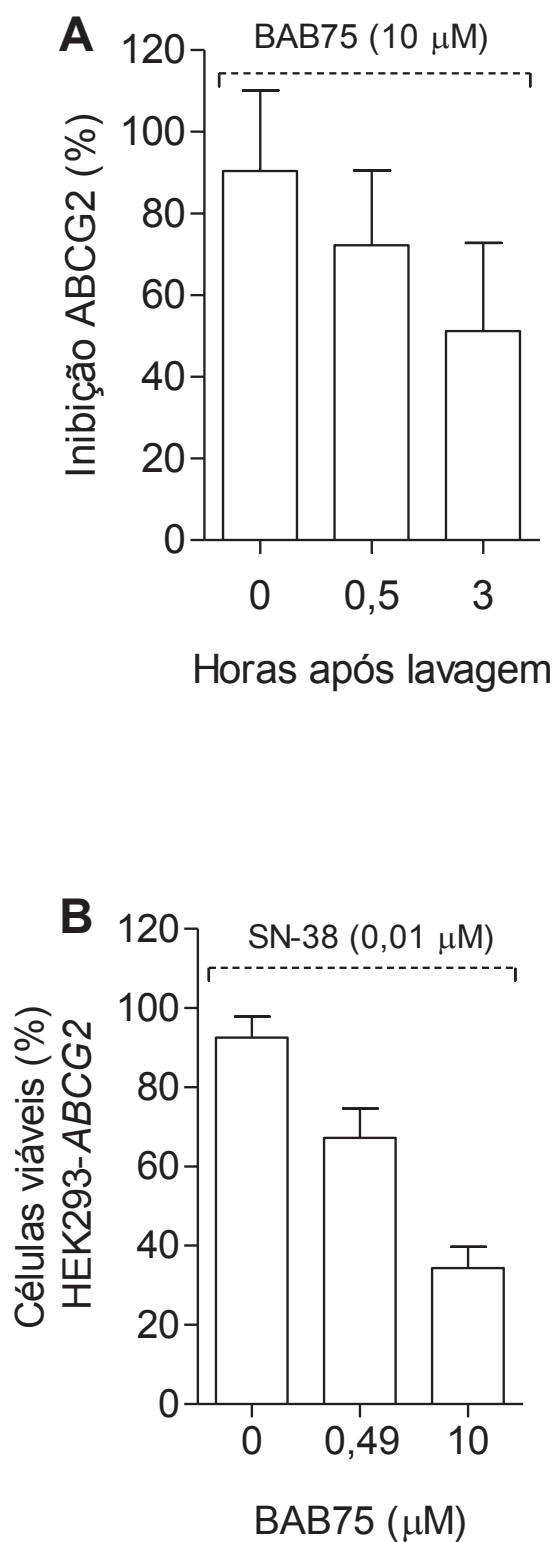
NOTA: (A) Região de interação do isômero R (azul) e do isômero S (vermelho) do derivado de carbazoles BAB75. (B) Mapa dos principais aminoácidos e suas respectivas interações com ambos os isômeros, representadas através de linhas tracejadas. Dentre as linhas tracejadas, pontes de hidrogênio estão representadas em verde e as demais representam interações do tipo hidrofóbica.

5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BAB75 NA REVERSÃO DA RESISTÊNCIA MEDIADA PEO TRANSPORTADOR ABCG2

Os ensaios de inibição normalmente são realizados em um curto período de incubação, neste caso em 30 minutos. Para avaliar se a inibição do transportador é mantida durante longos períodos de incubação, mimetizando modelos pré-clínicos, primeiramente realizamos um ensaio de remoção do inibidor do meio de cultivo e testamos sua capacidade de continuar inibindo o transporte de mitoxantrona. Como pode ser observado na figura 23A, a remoção do inibidor do meio de cultivo diminui de maneira tempo dependente a inibição máxima produzida, chegando a reduzir aproximadamente 50% sua atividade. Esse resultado sugere uma ligação reversível com o transportador, resultado que pode implicar na ineficácia deste inibidor em modelos pré-clínicos.

Para explorar a utilidade do BAB75, um ensaio de reversão da resistência mediado pelo transportador ABCG2 foi realizado. Neste ensaio as células HEK293-ABCG2 foram tratadas por 72h com o metabólito ativo do quimioterápico irinotecano, o SN-38. O SN-38 é transportado por ABCG2 e normalmente empregado como primeira escolha em ensaios de reversão. As células HEK293-ABCG2 tratadas com SN-38 também foram concomitantemente tratadas com o BAB75 em duas diferentes concentrações: 0,49 μM (IC_{50}) e 10 μM (concentração saturante). Conforme podemos observar na figura 23B, o co-tratamento das células HEK293-ABCG2 com SN-38 e BAB75 potencializa o efeito citotóxico do SN-38, confirmando em um ensaio de longo período, neste caso 72h, que o BAB75 possui capacidade de reverter a resistência mediada pelo transportador ABCG2. Ainda neste ensaio é possível observar que mesmo utilizando a concentração referente ao IC_{50} de inibição, o co-tratamento potencializou o efeito do SN-38 (Fig. 23B). Apesar do ensaio de lavagem apresentado na figura 23A sugerir que o BAB75 pode apresentar problemas em etapas pré-clínicas, o resultado apresentado na figura 23B sugere que mesmo em baixas concentrações no meio de cultivo o BAB75 continua ativo.

FIGURA 23 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BAB75 NA REVERSÃO DA RESISTÊNCIA REALIZADA PELO TRANSPORTADOR ABCG2



FONTE: O Autor (2019).

NOTA: (A) Células HEK293-ABCG2 foram expostas à concentração saturante do BAB75 (10 μ M) e incubadas por três intervalos de tempo distintos após lavagem com solução salina, como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.6. A porcentagem de inibição foi determinada

usando o Ko143 (0,5 μ M) como referencial de 100% de inibição. Os valores foram obtidos a partir da determinação do acúmulo intracelular de mitoxantrona por citometria de fluxo como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.4. Os resultados foram expressos como percentuais de inibição em relação ao controle e representam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes. (B) Células HEK293-*ABCG2* foram expostas à 10 nM de SN-38 em co-tratamento com o BAB75 nas concentrações de 0,49 μ M e 10 μ M (IC_{50} e saturante, respectivamente) por 72 horas. O percentual de células viáveis foi determinado utilizando controles tratados apenas com DMSO. Os valores foram obtidos a partir do método de MTT, como descrito na seção de Materiais e Métodos item 4.5. Os resultados foram expressos como percentual de células viáveis em relação ao controle e representam a média $\pm$ DP de três experimentos realizados em triplicata.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo identificou uma nova classe de compostos como inibidores seletivos do transportador ABCG2, os derivados de carbazoles. Além de seletivos para o transportador ABCG2, alguns compostos apresentaram um excelente potencial de inibição, com valores de IC_{50} inferiores a 1 μM . Os derivados de carbazoles além de seletivos não apresentaram citotoxicidade.

O melhor inibidor identificado foi o BAB75, que apresentou um valor de IC_{50} de 0,49 μM e uma razão terapêutica superior a 200, característica que viabiliza futuros testes pré-clínicos com este inibidor. A inibição de ABCG2 promovida pelo BAB75 foi confirmada frente a outro substrato de ABCG2, o Hoechst 33342, o que caracteriza seu potencial inibitório como substrato independente.

Quanto ao mecanismo inibitório do BAB75, o mesmo promove uma inibição do tipo não competitiva, não afeta a ligação do anticorpo conformacional 5D3 ao *loop* extracelular do transportador ABCG2 e também não interfere na atividade ATPase do transportador. O potencial uso deste inibidor em futuros ensaios pré-clínicos foi confirmado pela sua capacidade de reverter a resistência mediada pelo transportador ABCG2 em ensaios de longa duração (72h).

Demonstrou-se que o core aromático da molécula do BAB75 é fundamental para interagir com o sítio de ligação do transportador ABCG2, localizado na cavidade 1, uma vez que ambos os isômeros R e S do composto realizam, majoritariamente, ligações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos presentes nos TMDs do transportador. A interação da fenilalanina (Phe 439), principal aminoácido identificado nas interações de ambos os enantiômeros do BAB75 com ABCG2, com anéis aromáticos ressalta a importância de se preservar o arcabouço hidrofóbico da molécula durante o processo de síntese de novos derivados de carbazoles para futuras avaliações de suas capacidades inibitórias frente ao transportador ABCG2.

7. PERSPECTIVAS

- Confirmar a capacidade de reversão da resistência mediada pelo transportador ABCG2 utilizando células de linhagem de câncer que foram selecionadas para superexpressar o transportador ABCG2 por pressão com quimioterápicos;
- Verificar se o inibidor é capaz de afetar os níveis de expressão do transportador ABCG2 após 72h de tratamento através de ensaios de western-blot;
- Realizar ensaio clonogênico em sistema de agarose com uma mistura de células tumorais e fibroblastos para confirmar seu potencial como inibidor do transportador ABCG2 capaz de sensibilizar tumores resistentes devido a superexpressão do transportador ABCG2.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J. et al. Clinical A Phase I Study of the P-Glycoprotein Antagonist Tariquidar in Combination with Vinorelbine. **Cancer Therapy**, v. 15, n. 10, p. 3574–3583, 2009.

AHMED-BELKACEM, A. et al. Flavonoid Structure-Activity Studies Identify 6-Prenylchrysin and Tectochrysin as Potent and Specific Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein ABCG2. **Cancer Research**, v. 65, n. 11, p. 4852–4860, 2005.

ALLEN, S. L. et al. Dose Escalation Studies of Cytarabine , Daunorubicin , and Etoposide With and Without Multidrug Resistance Modulation With PSC-833 in Untreated Adults With Acute Myeloid Leukemia Younger Than 60 Years : Final Induction Resu. **Journal of clinical oncology**, v. 22, n. 21, 2015.

ALLER, S. G. et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. **Science**, v. 323, n. 5922, p. 1718–1722, 2009.

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.

ALLIKMETS, R.; DEAN, M.; RZHETSKY, A. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. **Cancer research**, v. 4, p. 1156–1166, 2001.

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

BANDGAR, B. P. et al. Synthesis, biological evaluation, and docking studies of 3-(substituted)-aryl-5-(9-methyl-3-carbazole)-1H-2-pyrazolines as potent anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 18, p. 5839–5844, 2012.

BASHIR, M. et al. Recent developments and biological activities of n-substituted carbazole derivatives: A review. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 13496–13517, 2015.

BERGER, D. et al. Novel multidrug resistance reversal agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2145–2161, 1999.

BIAMONTE, M. A.; WANNER, J.; LE ROCH, K. G. Recent advances in malaria drug discovery. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 10, p. 2829–2843, 2013.

BORST, P. Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what? **Open Biol**, v. 2, n. 5, p. 120066, 2012.

BOUAZIZ, Z. et al. Biologically active carbazole derivatives: focus on

oxazinocarbazoles and related compounds. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 180–188, 2014.

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.

BRENDEL, C. et al. Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. **Leukemia**, v. 21, n. 6, p. 1267–1275, 2007.

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

CARRATO, A. et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus either sunitinib or placebo in metastatic colorectal cancer: A randomized, phase III trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 10, p. 1341–1347, 2013.

CARUSO, A. et al. Efficient and simple synthesis of 6-aryl-1,4-dimethyl-9H-carbazoles. **Molecules**, v. 13, n. 6, p. 1312–1320, 2008.

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.

CHEARWAE, W. Modulation of the function of the multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2 by the cancer chemopreventive agent curcumin. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 8, p. 1995–2006, 2006.

CHEN, Z. et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. **Cancer Letters**, v. 370, n. 1, p. 153–164, 2016.

COLE, S. P. C. et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science**, v. 258, n. 5088, p. 1650–1654, 1992.

COLE, S. P. C. Multidrug resistance protein 1 (mrp1, abcc1), a “multitasking” atp-binding cassette (abc,) transporter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 45, p. 30880–30888, 2014.

CURRAN, S. et al. Architecture of Chimeric Spheroids Controls Drug Transport. **Cancer Microenvironment**, v. 8, n. 2, p. 101–109, 2015.

DALPIAZ, A.; PAVAN, B. Nose-to-brain delivery of antiviral drugs: A way to overcome their active efflux? **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1–15, 2018.

DASSA, E.; BOUIGE, P. The ABC of ABCs: A phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 3–4, p. 211–229, 2001.

DOHSE, M. et al. Comparison of ATP-Binding Cassette Transporter Interactions with the Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib, Nilotinib, and

Dasatinib. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 8, p. 1371–1380, 2010.

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

DOYLE, L. A.; ROSS, D. D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7340–7358, 2003.

EADIE, L. N.; HUGHES, T. P.; WHITE, D. L. Interaction of the Efflux transporters ABCB1 and ABCG2 with imatinib, nilotinib, and dasatinib. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 95, n. 3, p. 294–306, 2014.

FORD, R. C. Learning the ABCs one at a time : structure and mechanism of ABC transporters. **Portland Press**, p. 1–14, 2019.

FOX, E.; BATES, S. E. Tariquidar (XR9576): A P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 7, n. 4, p. 447–459, 2007.

FRIEDENBERG, W. R. et al. Phase III study of PSC-833 (valspodar) in combination with vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (valspodar/VAD) versus VAD alone in patients with recurring or refractory multiple myeloma (E1A95): A trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. **Cancer**, v. 106, n. 4, p. 830–838, 2006.

GALLUS, J.; JUVALE, K.; WIESE, M. Characterization of 3-methoxy flavones for their interaction with ABCG2 as suggested by ATPase activity. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1838, n. 11, p. 2929–2938, 2014.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug Resistance in Cancer: Role of Atp-Dependent Transporters. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, 2002.

GOZZI, G. J. et al. Phenolic indeno[1,2-b]indoles as ABCG2-selective potent and non-toxic inhibitors stimulating basal ATPase activity. **Drug design, development and therapy**, v. 9, p. 3481–3495, 2015.

GUILLONNEAU, C. et al. Synthesis of 9-O-substituted derivatives of 9-hydroxy-5,6-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole-1-carboxylic acid (2-(dimethylamino)ethyl)amide and their 10- and 11-methyl analogues with improved antitumor activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2191–2203, 1999.

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. Abc Transporters - From Microorganisms To Man. **Annual Review of Cell Biology**, v. 8, p. 67–113, 1992.

JACKSON, S. M. et al. Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 25, n. 4, 2018.

JANI, M. et al. Structure and function of BCRP, a broad specificity transporter of xenobiotics and endobiotics. **Archives of toxicology**, v. 88, n. 6, p. 1205–1248, 2014.

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.

JUVALE, K.; WIESE, M. Design of inhibitors of BCRP/ABCG2. **Future medicinal chemistry**, v. 7, n. 12, p. 1521–1527, 2015.

KANNAN, P. et al. The “specific” P-glycoprotein inhibitor Tariquidar is also a substrate and an inhibitor for breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). **ACS chemical neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 82–89, 2011.

KAPOOR, P. et al. ABCG2: does resolving its structure elucidate the mechanism? **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 6, p. 1485–1494, 2018.

KIM, Y.; CHEN, J. Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. **Science**, v. 359, n. 6378, p. 915–919, 2018.

KNÖLKER, H.-J.; REDDY, K. R. Isolation and Synthesis of Biologically Active Carbazole Alkaloids. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 11, p. 4303–4428, 2002.

LAMERA, E. et al. Sequential MCR/Fisher indolization strategy for the construction of polycyclic carbazole derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 13, p. 1305–1307, 2017.

LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 204, n. 3, p. 216–237, 2005.

LHOMMÉ, C. et al. Phase III study of valspodar (PSC 833) combined with paclitaxel and carboplatin compared with paclitaxel and carboplatin alone in patients with stage IV or suboptimally debulked stage III epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 16, p. 2674–2682, 2008.

MIYAKE, K. et al. Molecular Cloning of cDNAs Which Are Highly Overexpressed in Mitoxantrone-resistant Cells. **Cancer Research**, v. 59, n. 1, p. 8–13, 1999.

MORSCHHAUSER, F. et al. Phase I/II trial of a P-glycoprotein inhibitor, Zosuquidar.3HCl trihydrochloride (LY335979), given orally in combination with the CHOP regimen in patients with non-Hodgkin's lymphoma. **Leukemia and Lymphoma**, v. 48, n. 4, p. 708–715, 2007.

NAGAPPAN, T. et al. Biological activity of carbazole alkaloids and essential oil of murraya koenigii against antibiotic resistant microbes and cancer cell lines. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9651–9664, 2011.

NATARAJAN, K. et al. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. **Biochemical pharmacology**, v. 83,

n. 8, p. 1084–1103, 2012.

NEUMANN, J.; ROSE-SPERLING, D.; HELLMICH, U. A. Diverse relations between ABC transporters and lipids: An overview. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 4, p. 605-618, 2017.

NGUYEN, C.-H. et al. Antitumor Activity of Pyridocarbazole and Benzopyridoindole Derivatives that Inhibit Protein Kinase CK2. **Cancer Research**, v. 70, n. 23, p. 9865–9874, 2010.

NIELSEN, D. L. et al. Implications of ABCG2 expression on irinotecan treatment of colorectal cancer patients: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, 2017.

PAN, Y.; CHOTHE, P. P.; SWAAN, P. W. Identification of novel breast cancer resistance protein (BCRP) inhibitors by virtual screening. **Molecular pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 1236–1248, 2013.

PAYEN, L. et al. MBL-II-141, a chromone derivative, enhances irinotecan (CPT-11) anticancer efficiency in ABCG2-positive xenografts. **Oncotarget**, v. 5, n. 23, 2014.

PENA-SOLORZANO, D. et al. ABCG2/BCRP: Specific and Nonspecific Modulators. **Medicinal research reviews**, v. 37, n. 5, p. 987-1050, 2017.

PIRES, A. DO R. A. et al. New, highly potent and non-toxic, chromone inhibitors of the human breast cancer resistance protein ABCG2. **European journal of medicinal chemistry**, v. 122, p. 291–301, 2016.

PUENTES, C. O. et al. Solid phase synthesis of tariquidar-related modulators of ABC transporters preferring breast cancer resistance protein (ABCG2). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 12, p. 3654–3657, 2011.

RANGEL, L. P. et al. New structure-activity relationships of chalcone inhibitors of breast cancer resistance protein: polyspecificity toward inhibition and critical substitutions against cytotoxicity. **Drug design, development and therapy**, v. 7, p. 1043–1052, 2013.

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. Pheophorbide a Is a Specific Probe for ABCG2 Function and Inhibition. **Cancer Research**, v. 64, n. 4, p. 1242–1246, 2005.

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.

RUFF, P. et al. A randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 study of docetaxel compared to docetaxel plus zosuquidar (LY335979) in women with metastatic or locally recurrent breast cancer who have received one prior chemotherapy regimen. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 763–768, 2009.

SAMALIN, E. et al. Sorafenib and irinotecan (NEXIRI) as second- or later-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer and KRAS-

mutated tumours: A multicentre Phase I/II trial. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 5, p. 1148–1154, 2014.

SCHINKEL, A. H. et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. **Cell**, v. 77, n. 4, p. 491–502, 1994.

SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 138–153, 2012.

SCHMIDT, A. W.; REDDY, K. R.; KNÖLKER, H.-J. Occurrence, Biogenesis, and Synthesis of Biologically Active Carbazole Alkaloids. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 6, p. 3193–3328, 2012.

SHAO, K. P. et al. Synthesis and biological evaluation of novel pyrimidine-benzimidazol hybrids as potential anticancer agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 16, p. 3877–3881, 2014.

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. 1, p. 176–264, 2019.

SZAKACS, 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. 5753–74, 2014.

SZENTE, L. et al. Cholesterol Potentiates ABCG2 Activity in a Heterologous Expression System: Improved in Vitro Model to Study Function of Human ABCG2. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, n. 3, p. 1085–1094, 2007.

SZILAGYI, J. T. et al. Localization of the placental BCRP/ABCG2 transporter to lipid rafts: Role for cholesterol in mediating efflux activity. **Placenta**, v. 55, p. 29–36, 2017.

SZÖLLÖSI, D. et al. Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1860, n. 4, p. 818–832, 2018.

TAMAKI, A. et al. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. **Essays in biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 209–232, 2011.

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

VALDAMERI, G. et al. Methoxy Stilbenes as Potent, Specific, Untransported, and Noncytotoxic Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 322–330, 2011.

VALDAMERI, G. et al. Investigation of chalcones as selective inhibitors of the breast cancer resistance protein: Critical role of methoxylation in both inhibition potency and cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 3193–3200, 2012.

VALDAMERI, G.; GENOUX, E.; PERES, B. Substituted chromones as highly potent nontoxic inhibitors, specific for the breast cancer resistance protein. **J. Med. Chem.**, v. 55, n. 7, p. 3193–3200, 2012.

WANG, H. et al. Mechanisms of verapamil-enhanced chemosensitivity of gallbladder cancer cells to platinum drugs: Glutathione reduction and MRP1 downregulation. **Oncology Reports**, v. 29, n. 2, p. 676–684, 2013.

WESTOVER, D.; LI, F. New trends for overcoming ABCG2/BCRP-mediated resistance to cancer therapies. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 34, p. 159, 2015.

WIESE, M. BCRP/ABCG2 inhibitors: a patent review (2009-present). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 25, n. 11, p. 1229–1237, 2015.

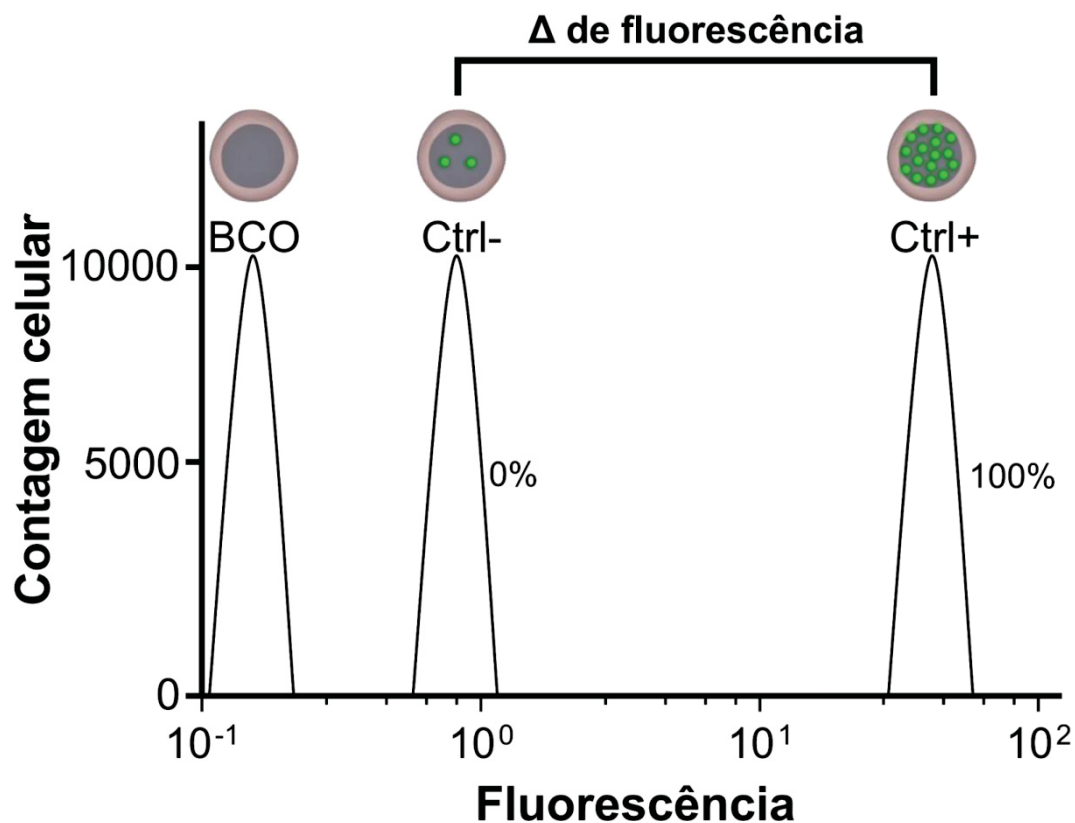
WINTER, E. et al. Quinoxaline-substituted chalcones as new inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2: polyspecificity at B-ring position. **Drug design, development and therapy**, v. 8, p. 609–619, 2014.

WRIGHT, J. et al. Substrate polyspecificity and conformational relevance in ABC transporters: new insights from structural studies. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 6, p. 1475–1484, 2018.

ZHANG, X.-Y. et al. Synthesis and anticancer activities of novel 1,2,4-triazolo[3,4-a]phthalazine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 235–244, 2014.

ANEXO 1 – PERCENTUAL DE INIBIÇÃO: FUNDAMENTOS ANALÍTICOS E MEMORIAL DE CÁLCULOS

Os ensaios delineados para demonstração quantitativa da capacidade inibitória dos derivados de carbazoles frente aos transportadores ABC foram realizados segundo o método de citometria de fluxo, descrito anteriormente na seção de materiais e métodos, item 4.4. Neste âmbito, os dados brutos obtidos a partir de uma análise citométrica correspondem a unidades arbitrárias de fluorescência intracelular, a qual é detectada em função da contagem celular individual de uma dada amostra (também conhecida como “evento”). Para garantir a acurácia dos resultados obtidos através deste método, estabeleceu-se o rigor para obtenção de dados brutos correspondentes à média de, no mínimo, 10.000 eventos. Pode-se observar a seguir a representação esquemática de um ensaio citométrico hipotético realizado ao longo do presente estudo.



Fonte: O Autor (2019).

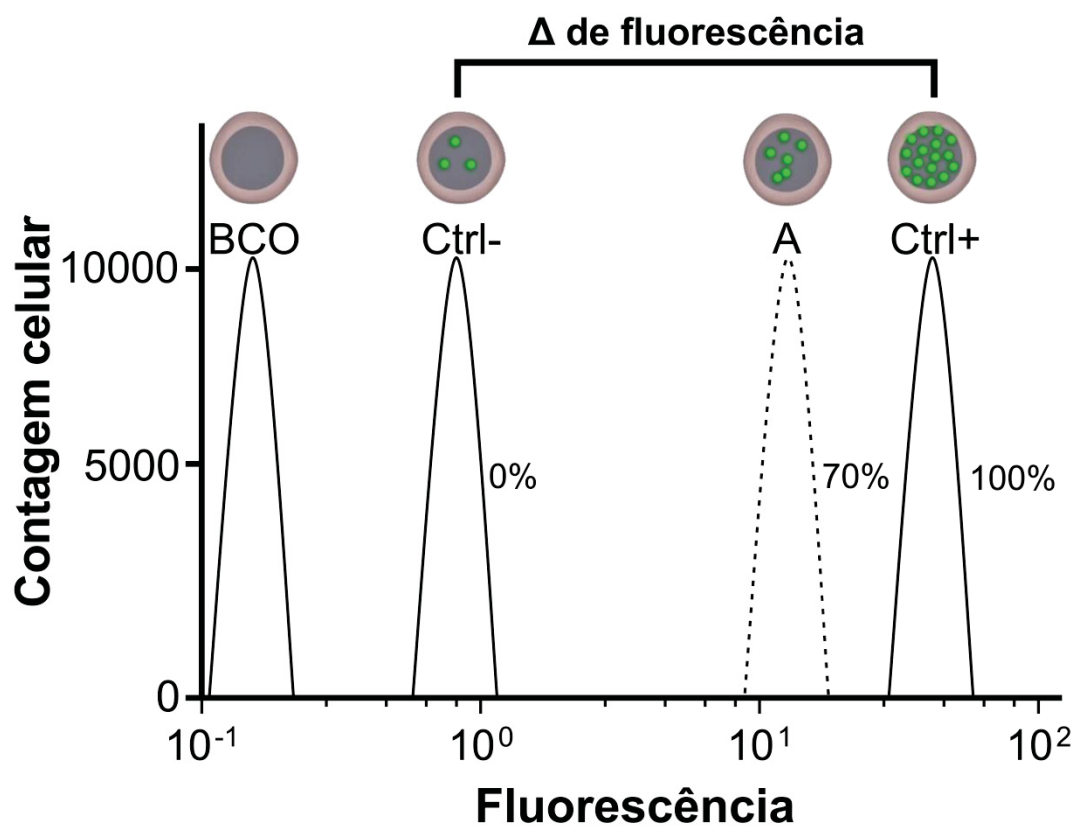
Foram utilizados substratos com perfil fluorescente para cada transportador ABC avaliado no presente estudo. Tais substâncias possuem a capacidade de emitir (transmitir e dispersar) luz detectável ao equipamento e, desta forma, atuar como sonda da atividade de efluxo mediada pelas referidas proteínas.

Empregou-se também três controles experimentais em todas as replicatas realizadas ao longo da pesquisa: branco experimental (BCO), controle negativo (Ctrl-) de inibição e controle positivo (Ctrl+) de inibição. Os esperados picos de fluorescência, correspondentes aos controles supracitados, encontram-se destacados na representação acima, da esquerda para a direita, respectivamente. O branco experimental apresenta o pico mais deslocado para a esquerda ao longo da abcissa, a qual representa a fluorescência detectada em escala logarítmica crescente; seu valor representa a autofluorescência celular verificada nas amostras não submetidas a quaisquer condições de tratamento e deve ser baixo a ponto de não impactar na análise das demais condições do teste. Os controles negativo e positivo de inibição correspondem,

respectivamente, aos índices mínimo e máximo de fluorescência obtidos no ensaio, os quais derivam do acúmulo intracelular de substrato e, portanto, são diretamente proporcionais à capacidade inibitória de compostos frente ao transportador ABC em teste. Para fins de validação de um ensaio citométrico, é mandatória a obtenção de um delta de fluorescência entre os controles positivo e negativo de inibição, cuja equação encontra-se demonstrada abaixo. Experimentos que não denotam tal condição são prontamente abortados.

$$\Delta = \frac{\text{fluorescência Ctrl} +}{\text{fluorescência Ctrl} -} \geq 2$$

Os ensaios que apresentam delta de fluorescência dentro dos limites de aceitação supramencionados são realizados integralmente e os picos de fluorescência obtidos a partir da leitura de amostras submetidas à diferentes condições de tratamento situam-se no espaço delimitado pelo delta entre os controles ao longo da abcissa, conforme exemplo a seguir:



Fonte: O Autor (2019).

Uma vez que a variável averiguada nesta modalidade de ensaios corresponde à capacidade inibitória de compostos frente aos transportadores ABC, espera-se que os picos de fluorescência das amostras tratadas com tais compostos (representados por “A” na imagem acima) localizem-se deslocados o máximo possível à direita, próximo ao controle positivo de inibição.

Os resultados apresentados neste estudo, expressos como percentuais de inibição relativos ao controle positivo de inibição, foram determinados matematicamente através da equação abaixo:

$$\frac{(I_{BAB} - S)}{(I_{Ref} - S)} \times 100 = \% \text{ inibição}$$

Onde:

I_{BAB} = fluorescência da amostra exposta ao substrato fluorescente e tratada com derivado de carbazoles;

I_{Ref} = fluorescência da amostra exposta ao substrato fluorescente e tratada com um inibidor de referência do transportador ABC em questão (controle positivo de inibição);

S = fluorescência da amostra exposta ao substrato fluorescente na ausência de inibidores (controle negativo de inibição).