

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIEGO LIMA GOMES

DESENVOLVIMENTO DE VESÍCULAS BASEADAS EM LIPÍDEOS COMO
SISTEMA DE LIBERAÇÃO DA CROMONA 4A COMO INIBIDOR DO
TRANSPORTADOR ABCG2

CURITIBA

2020

DIEGO LIMA GOMES

DESENVOLVIMENTO DE VESÍCULAS BASEADAS EM LIPÍDEOS COMO
SISTEMA DE LIBERAÇÃO DA CROMONA 4A COMO INIBIDOR DO
TRANSPORTADOR ABCG2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador Prof. Dr. Glaucio Valdameri.

Coorientador Prof. Dr. Marcel Ivan Ramírez Araya.

CURITIBA

2020

Gomes, Diego Lima

Desenvolvimento de vesículas baseadas em lipídeos como sistema de liberação da cromona 4a como inibidor do transportador ABCG2 [recurso eletrônico] / Diego Lima Gomes – Curitiba, 2020.

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

Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Glaucio Valdameri

Coorientador: Prof. Dr. Marcel Ivan Ramírez Araya

1. Transportador ABCG2. 2. Lipossomos. 3. Microvesículas. 4. Quimiorresistência. I. Valdameri, Glaucio. II. Araya, Marcel Ivan Ramírez. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 572.696



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
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 **DIEGO LIMA GOMES** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE VESÍCULAS BASEADAS EM LIPÍDEOS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DA CROMONA 4a COMO INIBIDOR DO TRANSPORTADOR ABCG2**, sob orientação do Prof. Dr. GLAUCIO VALDAMERI, que após terem inquirido o aluno e realizada 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, 28 de Fevereiro de 2020.

GLAUCIO VALDAMERI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ROBERTO ROSATI

Avaliador Externo (FACULDADE PEQUENO PRÍNCIPE -)

RILTON ALVES DE FREITAS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por todo apoio na escolha da profissão, pelo suporte, amor e compreensão.

Ao meu irmão, por todo carinho e amizade.

À minha esposa, pelo amor incondicional, pela parceria em todos os momentos, por cada detalhe, pela amizade e em especial pelo seu sorriso.

Ao meu orientador, prof. Dr. Glaucio Valdameri, pela confiança, pelo apoio imensurável, amizade e direcionamento em cada etapa.

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Marcel Ivan Ramírez Araya, pelo conhecimento, por toda disponibilidade e auxílio no desenvolvimento desse projeto.

À profa. Dra. Vivian Moure, pelo olhar crítico e enriquecedor.

Aos colegas e amigos do laboratório – em especial ao Diogo, Ingrid, Isadora, Giovana, Manoela e Marina – por trazerem leveza, parceria, companheirismo e amizades incríveis à essa jornada.

Ao Msc. Bruno Gavinho, por todo apoio e suporte na obtenção das microvesículas.

À Dr. Mariana Mazetto de Carvalho, por todo apoio e suporte na obtenção e caracterização dos lipossomas.

À técnica Carmen Ruviano, por todo apoio no laboratório de Imunologia.

Agradeço também ao programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade para concretizar esse projeto.

“Onde a ignorância se esconde, também estão as fronteiras da descoberta.”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o câncer representa um grupo de patologias que figura entre as com maior índice de mortalidade a nível global. Apesar dos diferentes mecanismos de atuação do tratamento medicamentoso, células cancerígenas costumam desenvolver mecanismos de resistência. Entre esses, destacamos a superexpressão de transportadores ABC, que promovem o efluxo de agentes antineoplásicos levando ao fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR, *Multidrug Resistance*). Visando reverter o fenômeno MDR, inibidores dos transportadores ABC foram desenvolvidos. A cromona 4a foi recentemente descrita como um inibidor potente e seletivo de ABCG2, um dos principais responsáveis pelo fenômeno MDR. Esse composto demonstrou-se extremamente potente e isento de citotoxicidade, e seu uso foi validado em ensaios em modelos animais. Entretanto, sua baixa solubilidade em água representa um enorme desafio em direção aos testes clínicos. Para produzir uma formulação farmacêutica compatível com ensaios clínicos, duas estratégias diferentes foram propostas: a primeira baseada em lipossomas e a segunda em microvesículas biológicas. Os lipossomas contendo cromona 4a inibiram a atividade do ABCG2 após 24 horas de incubação, demonstrando um IC₅₀ de 0,12 µM, similar à cromona 4a solubilizada diretamente em DMSO. Esse dado sugere que os lipossomas podem ser usados na entrega de inibidores de transportadores ABC, drogas normalmente hidrofóbicas que têm como alvo o sítio de ligação transmembrana dessas proteínas. As microvesículas de *Giardia intestinalis* também demonstraram potencial no transporte de cromona 4a. Microvesículas incubadas com 10 µM de cromona 4a inibiram completamente a atividade do transportador ABCG2. Por fim, a atividade inibitória das microvesículas carregando cromona 4a foi confirmada pelo ensaio de viabilidade celular em células superexpressando ABCG2. O tratamento com microvesículas incubadas com cromona 4a quimiosensibilizou as células cancerígenas aos efeitos citotóxicos do SN-38, metabólito ativo do quimioterápico Irinotecan. Como conclusão, esse estudo demonstrou pela primeira vez que lipossomas e microvesículas podem ser usados como mecanismos de entrega de inibidores dos transportadores ABC.

Palavras-chave: ABCG2. Lipossomas. Microvesículas. Quimioresistência.

ABSTRACT

According to World Health Organization, cancer represent a group of pathologies among those with highest mortality rates. Besides the different approaches for drug-based treatment, cancer cells often develop resistance mechanisms. Among them, we highlight the overexpression of ABC transporters, which promote the efflux of antineoplastic agents, leading to the phenomenon of MDR (Multidrug Resistance). In order to overcome the MDR phenotype, inhibitors of ABC transporters have been developed. Chromone 4a was recently described as a potent and specific inhibitor of ABCG2 transporter, one of the most important to trigger MDR. This drug was noncytotoxic and showed a highly potent ABCG2 inhibition effect. In addition, the use of chromone 4a was validated in xenografic animal models. However, due the highly hydrophobicity of this drug, its water solubility is considered the major challenge toward clinical trials. To produce a pharmaceutical formulation compatible with clinical models, we sucessfully proposed two different strategies: one based on liposomes and the second based on biological microvesicles. Liposomes carrying chromone 4a were able to inhibit the ABCG2 transporter activity after 24 hours of incubation, demonstrating an IC₅₀ of 0.12 μM, similar to chromone solubilized directly in DMSO. This data proved that liposomes can be applied to delivery ABC transporter inhibitors, that are normally hydrophobic drugs targeting the transmembrane binding site of these membrane proteins. In addition, microvesicles from *Giardia intestinalis* were also used to delivery chromone 4a. Microvesicles incubated with 10 μM of chromone 4a inhibited completely the ABCG2 transport activity. Finally, the inhibition activity of the microvesicles carrying chromone 4a was confirmed by a cell viability assay using cells overexpressing ABCG2. The treatment using microvesicles carrying chromone 4a fully chemosensitized these cells to SN-38, the active metabolit of the chemotherapeutic irinotecan. In conclusion, this study showed for the first time that liposomes and microvesicles can be used for delivery of inhibitors of ABC transporters.

Key-words: ABCG2. Liposomes. Microvesicles. Chemoresistance.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2020 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA.....	14
FIGURA 2	– ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DOS TRANSPORTADORES ABC E SUBSTRATOS DE INTERESSE.....	16
FIGURA 3	– ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO TRANSPORTADOR ABCG2.....	19
FIGURA 4	– REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DO MBL-II-141.....	21
FIGURA 5	– REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA CROMONA 4a.....	22
FIGURA 6	– CLASSIFICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS DE ACORDO COM TAMANHO E NÚMERO DE CAMADAS.....	23
FIGURA 7	– SOBREPOSIÇÃO DOS PICOS DE FLUORESCÊNCIA EM UM ENSAIO DE INIBIÇÃO MEDIADOS PELO ACÚMULO DE HOECHST 33342 NAS CONDIÇÕES CONTROLE.....	34
FIGURA 8	– SOBREPOSIÇÃO DOS PICOS DE FLUORESCÊNCIA EM UM ENSAIO DE INIBIÇÃO MEDIADOS PELO ACÚMULO DE HOECHST 33342 EM UM ENSAIO.....	35
FIGURA 9	– INIBIÇÃO DO EFLUXO DE HOECHST 33342 MEDIADO PELO TRANSPORTADOR ABCG2 REALIZADO POR LIPOSSOMAS CONTENDO CROMONA 4a.....	38
FIGURA 10	– INIBIÇÃO DO EFLUXO DE HOECHST 33342 MEDIADO PELO TRANSPORTADOR ABCG2 REALIZADO POR LIPOSSOMAS CONTENDO CROMONA 4a.....	39
FIGURA 11	– INCORPORAÇÃO DE HOECHST 33342 EM MICROVESÍCULAS DE <i>Giardia intestinalis</i>	41
FIGURA 12	– INIBIÇÃO DO EFLUXO DE HOECHST 33342 MEDIADO PELO TRANSPORTADOR ABCG2 REALIZADO POR MICROVESÍCULAS CONTENDO CROMONA 4a.....	42

FIGURA 13	– REVERSÃO DA RESISTÊNCIA AO SN-38 MEDIADA PELO TRANSPORTADOR ABCG2 REALIZADO POR MICROVESÍCULAS CONTENDO CROMONA 4a.....	44
-----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	– Cassete de ligação ao ATP (<i>ATP-Binding Cassette</i>)
ABCP	– Cassete de ligação ao ATP na Placenta (<i>ATP-Binding Cassette Placenta</i>)
ATP	– Adenosina trifosfato
BCA	– Ácido bichinchônico (<i>Bichinchonic acid</i>)
BCRP (ABCG2)	– Proteína de resistência do câncer de mama (<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>)
DMEM	– Meio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DOPE	– Dioleilfosfatidiletanolamina
DP	– Desvio Padrão
DSPC	– Diestearoilfosfatidilcolina
FSC	– Dispersão frontal (<i>Forward Scatter</i>)
FTC	– Fumitremorgina C
GUV	– Vesícula gigante unilamelar (<i>Giant unilamellar vesicle</i>)
HEK-293	– Célula humana renal embrionária (<i>Human Embryonic Kidney</i>)
HEK-WT	– Célula humana renal embrionária linhagem selvagem (<i>Human Embryonic Kidney Wild Type</i>)
IC50	– Concentração que inibe 50%
IDH	– Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	– Instituto Nacional de Câncer
LUV	– Vesícula grande unilamelar (<i>Large unilamellar vesicle</i>)
MDR	– Resistência a múltiplas drogas (<i>Multi Drug Resistance</i>)
MHC	– Complexo de Histocompatibilidade Maior (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
miRNA	– Micro RNA
MLV	– Vesícula multilamelar (<i>Multilamellar vesicle</i>)
MRP1 (ABCC1)	– Proteína associada a múltipla resistência (<i>Multi Resistance associated Protein</i>)

MXR	– Proteína de resistência à mitoxantrona (<i>Mitoxantrone Resistance Protein</i>)
MTT	– Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NBD	– Domínio de ligação de nucleotídeo (<i>Nucleotide-Binding Domain</i>)
OMS	– Organização Mundial de Saúde
PBS	– Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
Pgp (ABCB1)	– Glicoproteína-P
RNA _m	– RNA mensageiro
SAB	– Soro Adulto Bovino
SFB	– Soro Fetal Bovino
SNC	– Sistema Nervoso Central
SN-38	– Metabólito ativo do Irinotecano
SSC	– Dispersão lateral (<i>Side Scatter</i>)
SUV	– Vesícula pequena unilamelar (<i>Small unilamellar vesicle</i>)
TMD	– Domínio transmembrana (<i>Transmembrane Domain</i>)
TYI-S-33	– Meio Keister Modificado
WHO	– <i>World Health Organization</i>
WT	– Linhagem selvagem (<i>Wild Type</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER.....	14
2.2	TRANSPORTADORES ABC	15
2.3	TRANSPORTADOR ABCG2	18
2.4	INIBIDORES DO TRANSPORTADOR ABCG2.....	20
2.5	CROMONAS	21
2.6	LIPOSSOMAS	23
2.7	MICROVESÍCULAS.....	24
3	JUSTIFICATIVA	26
4	OBJETIVOS	28
4.1	OBJETIVO GERAL.....	28
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5	MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1	REAGENTES	29
5.2	LINHAGENS CELULARES.....	29
5.3	OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS	30
5.4	OBTENÇÃO DE MICROVESÍCULAS	30
5.5	ENSAIO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR ABCG2	32
5.6	ENSAIO DE REVERSÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA	36
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.1	LIPOSSOMAS	37
6.2	MICROVESÍCULAS.....	40
6.3	ENSAIO DE REVERSÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA MEDIADO POR SUPEREXPRESSÃO DE ABCG2.....	43
7	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Classificadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo patologias com elevado índice de mortalidade, as neoplasias apresentam difícil manejo clínico ao tratamento, levando à complicações, internamentos e agravamento do quadro clínico (INCA, 2020).

Um fator que coopera para o elevado índice de mortalidade do câncer é o fenômeno de resistência aos agentes quimioterápicos apresentado pelas células cancerígenas (FLETCHER et al.,2010). Dentre os mecanismos responsáveis por esse fenômeno, destaca-se a superexpressão de transportadores da família ABC (ABC, do inglês *ATP Binding Cassette*). Transportadores ABC são proteínas de membrana que, através da ligação e hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) promovem o transporte de diferentes substratos para o exterior celular, isso é, seu efluxo, sendo portanto responsáveis pela resistência a diferentes classes de agentes quimioterápicos, característica intrínseca ao fenômeno de resistência à múltiplas drogas (MDR, do inglês *Multidrug Resistance*) que restringe o tratamento (DEAN; HAMON; CHIMINI,2001; AMBUDKAR et al.,2003; GLAVINAS et al.,2004; BURKE; ARDEHALI,2007; KATHAWALA et al.,2015; FLETCHER et al.,2016; NEMCOVA-FURSTOVA et al.,2016; JACKSON et al.,2018).

A família de proteínas ABC é constituída de 48 membros, sendo os três principais representantes o transportador chamado de glicoproteína P (P-gp/ABCB1), a proteína associada ao fenótipo de multiresistência (MRP1/ABCC1) e a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP/ABCG2) (VAN LOEVEZIJN et al.,2001).

Para um tratamento efetivo do câncer, é necessário contornar os mecanismos de resistência, para tanto, estudos envolvendo inibidores dos transportadores ABC representam uma estratégia importante. Apesar de existirem inibidores da glicoproteína P para uso em testes clínicos, inibidores do transportador ABCG2 que estariam disponíveis para testes clínicos apresentam problemas farmacotécnicos relacionados ao seu perfil de solubilidade, estando, portanto, indisponíveis para teste na forma como se apresentam. Entre os compostos desenvolvidos como inibidores do transportador ABCG2, figura a cromona 4a, um inibidor potente e seletivo do transportador ABCG2 com excelentes resultados *in vitro* (PIRES et al.,2016) porém cuja insolubilidade em meio aquoso impede a utilização em ensaios clínicos.

Com o intuito de viabilizar testes pré-clínicos e futuramente clínicos com a cromona 4a, o presente estudo visa utilizar microvesículas de *Giardia intestinalis* e lipossomas como matrizes biológica e sintética, respectivamente, como potenciais encapsuladores desse composto e testar a capacidade dessas matrizes de liberar a cromona 4a desencadeando seu efeito inibitório sobre o transportador ABCG2.

A formulação envolvendo microvesículas de *Giardia intestinalis*, referida como matriz biológica, representa nesse estudo uma prova conceitual, cujo intuito é estudar a capacidade das microvesículas de origem biológica de interagirem com a cromona 4a, se a ligação formada é estável e resiste à centrifugação (etapa importante na eliminação do solvente utilizado na solubilização da cromona 4a), se a formulação pronta apresenta capacidade de liberar o composto para as células no estudo *in vitro* e se ele mantém sua atividade farmacológica após os procedimentos envolvidos na sua formulação nessa matriz biológica.

Havendo uma resposta positiva nessa prova conceitual, o intuito é progredir o estudo para microvesículas provenientes de células do próprio paciente, apresentando, portanto, compatibilidade total (BALACHANDRAN; YUANA, 2019).


2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

De acordo com a OMS câncer é a segunda principal causa de morte no mundo (IARC, 2018). 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.

A distribuição de incidência para as diferentes neoplasias apresenta diferentes perfis relacionados ao sexo, no Brasil a população masculina é mais susceptível estatisticamente ao câncer de próstata (29,2%), seguido pelo de cólon e reto (9,1%) e de traqueia, brônquio e pulmão (7,9%). A população feminina, por sua vez, apresenta como mais incidente o câncer de mama (29,7%), seguido pelo de cólon e reto (9,2%) e colo do útero (7,5%), como pode ser observado na figura 1 (INCA, 2020).

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2020 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA.

Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%		Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%		Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%		Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

FONTE: INCA (2020).

Em escala global, estima-se que o risco acumulado de incidência para um indivíduo desenvolver câncer ao longo de sua vida seja de 12,5% para os homens e 10% para as mulheres, observando-se ainda que, a despeito de diferenças no Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), países subdesenvolvidos e países com elevado IDH apresentam índices de mortalidade comparáveis, caracterizando a gravidade da patologia em diferentes contextos sociais e de cuidados à saúde (BRAY et al.,2018).

Contribui para a elevada taxa de mortalidade desse conjunto de patologias a resistência apresentada ao tratamento, que pode ser intrínseca – quando presente desde o diagnóstico – ou adquirida, isso é, evidenciada após o tratamento e

normalmente caracterizada como recidiva, ambas representando umas das principais causas da mortalidade do câncer (WANG; ZHANG; CHEN,2019). Essa resistência é mediada por diferentes mecanismos, como mutações genéticas, epigenéticas, seleção de subpopulações resistentes ao tratamento, alterações no sítio-alvo e o efluxo mediado pela superexpressão de transportadores ABC (WANG; ZHANG; CHEN,2019).

2.2 TRANSPORTADORES ABC

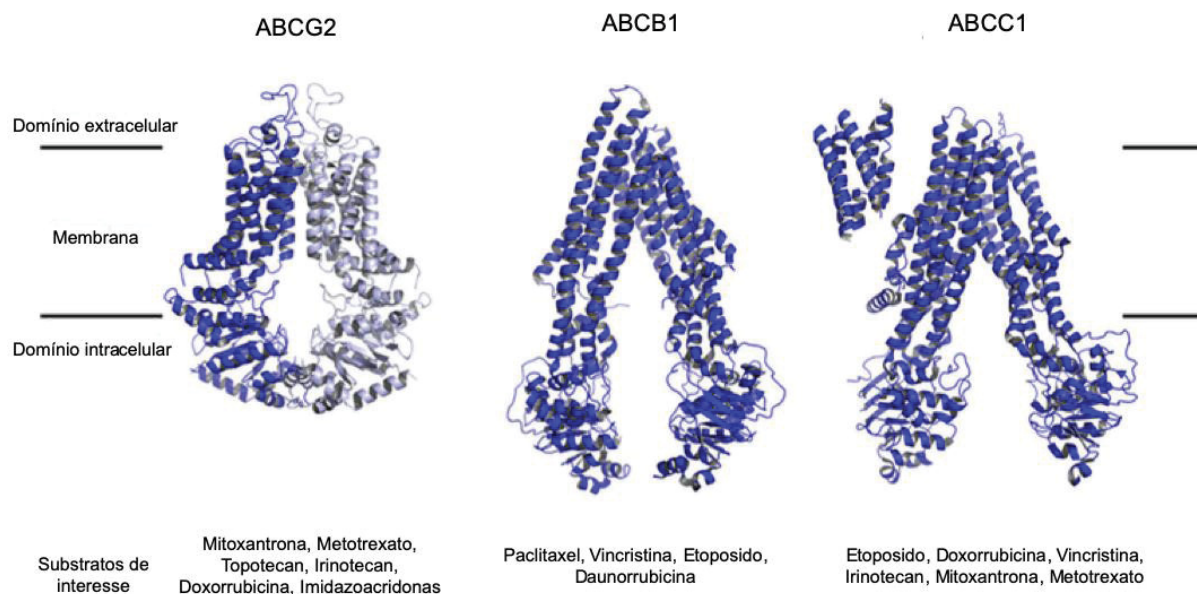
O genoma humano codifica 48 proteínas da família ABC, classificadas em 7 subfamílias (desde a subfamília A até a subfamília G) de acordo com homologias estruturais (DEAN; HAMON; CHIMINI,2001; AMBUDKAR et al.,2003; MOHAMMAD; HE; YIN,2018; ROBEY et al.,2018).

Alguns transportadores ABC são constitucionalmente expressos em vários tecidos do organismo, desempenhando papel importante na homeostase celular, transporte de peptídeos, apresentação de antígeno do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) e em processos de detoxificação e transporte (GOTTESMAN,2002; SCHINKEL; JONKER,2003; BURKE; ARDEHALI,2007; CHAPUY et al.,2008; KASHIWAYAMA et al.,2009; TAYLOR et al.,2017).

Estruturalmente os transportadores ABC apresentam um domínio citoplasmático de ligação a nucleotídeos (conhecidos como NBD, do inglês *Nucleotide Binding Domain*), onde ocorre a ligação e a hidrólise de ATP, e domínios transmembrana (conhecidos como TMD, do inglês *Transmembrana Domain*), que realizam a ligação e o transporte dos substratos (FIGURA 2) (DEAN; HAMON; CHIMINI,2001).

Importante frisar que nem todos os membros da família de transportadores ABC atuam, necessariamente, transportando substratos como uma bomba ATP-dependente, à exemplo do transportador ABCC7, que funciona como um canal iônico que desempenha papel importante no efluxo de íons cloro (DEELEY; WESTLAKE; COLE,2006).

FIGURA 2 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DOS TRANSPORTADORES ABC E SUBSTRATOS DE INTERESSE.



LEGENDA: ABCG2 (Proteína de resistência do câncer de mama, PDB ID 5NJ3), ABCB1 (glicoproteína P, PDB ID 5KPI), ABCC1 (Proteína associada a múltipla resistência, PDB ID 5UJ9).

FONTE: Adaptado de Robey et al (2018).

O NBD dos transportadores ABC é a região conservada, apresentando elevada similaridades entre membros, entretanto, o TMD apresenta considerável heterogeneidade, resultando na enorme gama de substratos reconhecidos e transportados (DEAN; HAMON; CHIMINI,2001).

O primeiro transportador descrito foi a glicoproteína-P (P-gp), codificada pelo gene ABCB1. A P-gp é uma proteína de 170 kDa, constituída por dois domínios NBD e 12 domínios TMD, de localização apical e que pode ser encontrada no tecido hepático, renal, na placenta, na barreira hematoencefálica, intestinos e glândulas adrenais, sendo responsável pela resistência a uma miríade de agentes antineoplásicos, como paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, doxorubicina, daunorubicina, entre outros (ALLEN et al.,2002; GOTTESMAN; FOJO; BATES,2002; SODANI et al.,2012).

A superexpressão de alguns membros da família ABC é de extrema relevância no fenômeno MDR, em especial ABCB1, ABCC1 e ABCG2 (GLAVINAS et al.,2004; YOH et al.,2004; SZAKACS et al.,2008; KATHAWALA et al.,2015; JACKSON et al.,2018).

Com o aumento desses transportadores na membrana citoplasmática da linhagem neoplásica ocorre aumento do efluxo celular de agentes neoplásicos de forma inespecífica, conferindo fenótipo de resistência ao tratamento (WEEN et

al.,2015). Esse fenômeno é extremamente impactante no tratamento haja vista a inespecificidade do transporte, afetando agentes antineoplásicos de distintas classes, sendo, portanto, um mecanismo de resistência que afeta várias estratégias de tratamento simultaneamente (SHAROM,2008).

Em virtude do papel dos transportadores ABC no transporte de agentes antineoplásicos em diferentes tipos de câncer (TABELA 1), atualmente se busca por potenciais inibidores desses transportadores.

Corroborando com esse importante papel no fenômeno de MDR o estudo de Szakács e colaboradores (2004), que quantificou a expressão de RNA mensageiro (RNAm), que codifica para transportadores ABC, por RT-PCR, em 60 linhagens cancerígenas diferentes, e comparou os resultados com seus respectivos fenótipos de resistência, evidenciando forte correlação entre a superexpressão dos transportadores ABC em células cancerígenas e o fenômeno MDR, assim como características de malignidade mais pronunciadas (WEINSTEIN et al.,1991; SZAKACS et al.,2004).

TABELA 1 – TRANSPORTADORES ABC E SUA EXPRESSÃO EM DIFERENTES NEOPLASIAS.

TRANSPORTADOR ABC	SUPEREXPRESSOS NAS SEGUINTEs NEOPLASIAS
ABCA2	Câncer de pulmão, Leucemia Mielóide Aguda
ABCA3	Neuroblastoma
ABCB1	Câncer de pulmão, Leucemia Mielóide Aguda
ABCB5	Melanoma
ABCC1	Carcinoma de células escamosas, câncer de pulmão, glioma, Leucemia Mielóide Aguda
ABCG2	Câncer de pulmão, Leucemia Mielóide Aguda, câncer de esôfago, neuroblastoma, glioma, câncer de células escamosas, câncer de ovário, câncer de mama

FONTE: Adaptado de Fletcher et al (2016).

2.3 TRANSPORTADOR ABCG2

O transportador ABCG2 foi descoberto simultaneamente por três grupos de pesquisa, justificando a existência de diferentes denominações, sendo elas ABCP por sua abundância na placenta, BCRP pela sua descrição nas linhagens tumorais de câncer de mama (do inglês, *Breast Cancer Resistance Protein*) ou MXR, por conferir resistência à mitoxantrona (do inglês, *Mitoxantrone Resistance Protein*) (ALLIKMETS et al.,1998; DOYLE et al.,1998; MIYAKE et al.,1999).

O gene ABCG2 codifica para uma proteína que contém 1 NBD e 1 TMD e, por isso, ele é considerado pela literatura como “meio transportador” (OZVEGY-LACZKA et al.,2005; ROBEY et al.,2009; KHUNWEERAPHONG; STOCKNER; KUCHLER,2017).

Entretanto, sua forma funcional na membrana celular é homodimérica com uma massa molecular de aproximadamente 144 kDa (DEAN; HAMON; CHIMINI,2001). Esse gene localiza-se no cromossomo 4q22 (BAILEY-DELL et al.,2001).

São substratos de ABCG2 a mitoxantrona, topotecan, doxorubicina, daunorubicina, Irinotecano, SN-38 e Hoechst 33342 (DEAN; HAMON; CHIMINI,2001; ROBEY et al.,2001; MO; ZHANG,2012).

Fisiologicamente, o transportador ABCG2 apresenta-se expresso na próstata, ovários, testículos, sistema nervoso central (SNC), tendo elevada expressão na placenta e no intestino delgado, onde desempenha importante papel na proteção do feto e na detoxificação celular (DOYLE et al.,1998; JONKER et al.,2000), apresentando também papel secundário no metabolismo do ácido úrico (ISHIKAWA; AW; KANEKO,2013).

Visto sua importância no fenômeno de MDR e sendo parte do metabolismo de células tronco hematopoiéticas, foi desenvolvido o anticorpo monoclonal 5D3, que reconhece a porção extracelular do homodímero, isso é, o transportador ativo (OZVEGY-LACZKA et al.,2005).

Esse reconhecimento, além de possibilitar a pesquisa do transportador através de técnicas de citometria de fluxo e imunofluorescência, contribui também para caracterizar o funcionamento do transportador.

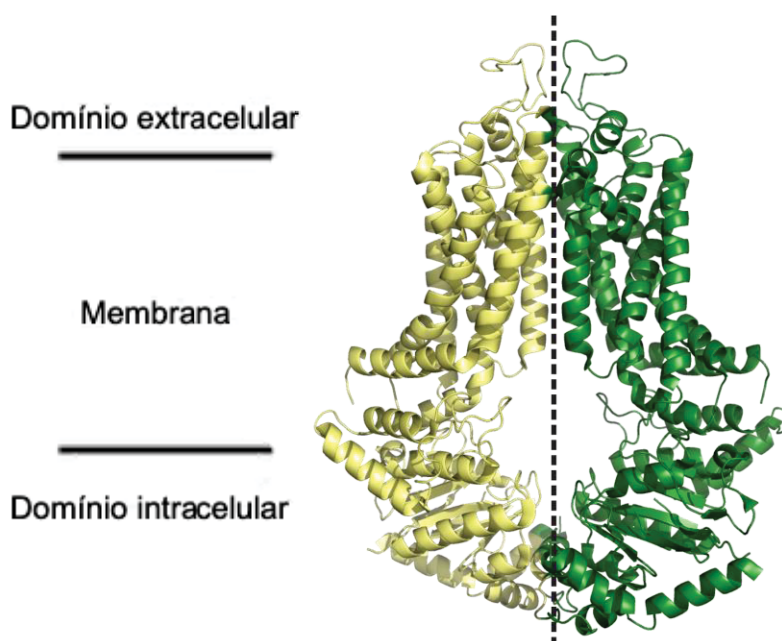
O estudo de Taylor e colaboradores (2017), responsável por caracterizar a estrutura do ABCG2 em alta resolução, demonstrou que o 5D3, ao ligar com a região

extracelular do transportador, une os domínios TMDs forçando a estrutura desse a permanecer estacionário na conformação aberta ao interior celular, promovendo impedimento alostérico do transporte de substrato e da ligação de ATP, informação relevante que auxiliou a compreensão dos mecanismos envolvidos no transporte de substrato (TAYLOR et al.,2017).

A conformação estrutural do transportador ABCG2, quando voltada para o interior celular, apresenta uma cavidade semelhante a uma fenda profunda, capaz de acomodar moléculas planas, policíclicas e hidrofóbicas, cuja estrutura é formada pelo alinhamento das regiões transmembrana TM2 e TM5 dos homodímeros.

Essa fenda precede outra cavidade menor, com menor afinidade pelo substrato, mais próxima da região extracelular porém ocluída nessa conformação estrutural, sugerindo que a mudança conformacional promovida pela ligação de ATP apresenta ao substrato um caminho de menor afinidade através do transportador até o meio extracelular, conforme ilustrado na Figura 3 (TAYLOR et al.,2017).

FIGURA 3 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO TRANSPORTADOR ABCG2.



LEGENDA: Estrutura tridimensional do transportador ABCG2, demonstrando a necessidade de homodimerização para seu funcionamento (PDB ID 5NJ3).

FONTE: Adaptado de Taylor et al (2017).

2.4 INIBIDORES DO TRANSPORTADOR ABCG2

Na tentativa de contornar o mecanismo de resistência mediado pelo transportador ABCG2, estudos envolvendo inibidores foram desenvolvidos (BOUMENDJEL et al.,2011; VALDAMERI et al., 2012a; VALDAMERI et al., 2012b; VALDAMERI et al., 2012c; VALDAMERI et al., 2012d; LECERF-SCHMIDT et al.,2013; PAYEN et al.,2014; GOZZI et al.,2015; JABOR GOZZI et al.,2015; PIRES et al.,2016), porém múltiplas circunstâncias dificultaram o avanço rumo aos testes clínicos (SODANI et al.,2012; ROBEY et al.,2018). O primeiro inibidor seletivo do transportador ABCG2 foi a Fumitremorgin C (FTC). Contudo, o uso do FTC é inviável na clínica devido sua elevada neurotoxicidade (RABINDRAN et al.,2000).

A busca por compostos com menor toxicidade levou à descoberta do composto Ko143, um análogo tetracíclico da FTC, caracterizado por ser mais potente que a FTC como inibidor do transportador ABCG2, porém apresentou neurotoxicidade residual em estudos *in vivo* (VAN LOEVEZIJN et al.,2001; ALLEN et al.,2002), sendo hoje utilizado como inibidor de referência em ensaios *in vitro*.

O grupo de Boumendjel descreveu em 2007 uma série de derivados de acridona, e o composto mais promissor apresentou um IC₅₀ (concentração que inibe 50% da atividade de transporte) de 0,35 µM (BOUMENDJEL et al.,2011). Derivados de resveratrol também foram testados apresentando IC₅₀ de 0,16 µM, porém com citotoxicidade residual (VALDAMERI et al., 2012a). Compostos derivados da FTC apresentaram IC₅₀ de 9 - 34 µM, associados a efeitos citotóxicos relevantes (ALLEN et al.,2002).

Outro exemplo envolvendo o uso de uma estrutura promissora como base para a obtenção de análogos é o GF120918/elacridar, utilizado como estrutura base das acridonas (BOUMENDJEL et al.,2007; ARNAUD et al.,2011), o qual foi substituído posteriormente por um núcleo de cromona, objetivando a elevação da capacidade inibitória do transportador ABCG2 (VALDAMERI et al., 2012c).

Nesse contexto, as cromonas aparecem como uma classe promissora de inibidores seletivos do transportador ABCG2 (VALDAMERI et al., 2012c; VALDAMERI et al., 2012d). A cromona 6g foi identificada em 2012 e descrita como o inibidor do transportador ABCG2 mais promissor descrito na literatura, devido sua potência de inibição e ausência de citotoxicidade, apresentando um IC₅₀ de 0,11 µM (VALDAMERI et al., 2012c). Devido a esses aspectos promissores a cromona 6g foi patenteada

ainda em 2012 com o nome de MBL-II-141 (INPI 01520002938). Posteriormente, o uso do MBL-II-141 foi validado em modelo animal (PAYEN et al.,2014; HENIN et al.,2017).

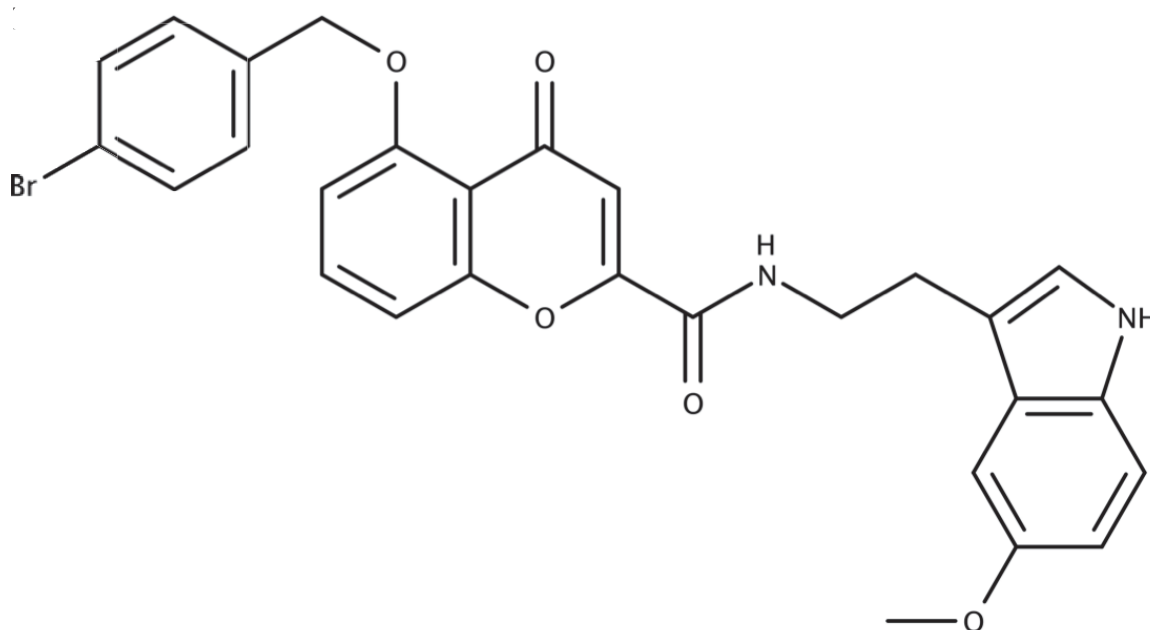
Os resultados em modelo pré-clínico foram excelentes, revertendo a resistência mediada pelo transportador ABCG2, contudo, a hidrofobicidade da molécula não permite sua solubilização em meio aquoso, por isso os estudos *in vitro* foram conduzidos solubilizando o MBL-II-141 em dimetilsulfóxido (DMSO) e os estudos *in vivo* solubilizando em DMSO e diluindo em óleo de girassol.

2.5 CROMONAS

As cromonas são compostos derivados do benzopirano com substituição por grupo ceto no anel pirano.

Esses compostos foram identificados como potentes e seletivos inibidores do transportador ABCG2. Com o intuito de obter análogos sintéticos mais potentes e menos tóxicos, uma série de modificações químicas foram conduzidas, até identificação do MBL-II-141 (FIGURA 4).

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DO MBL-II-141.

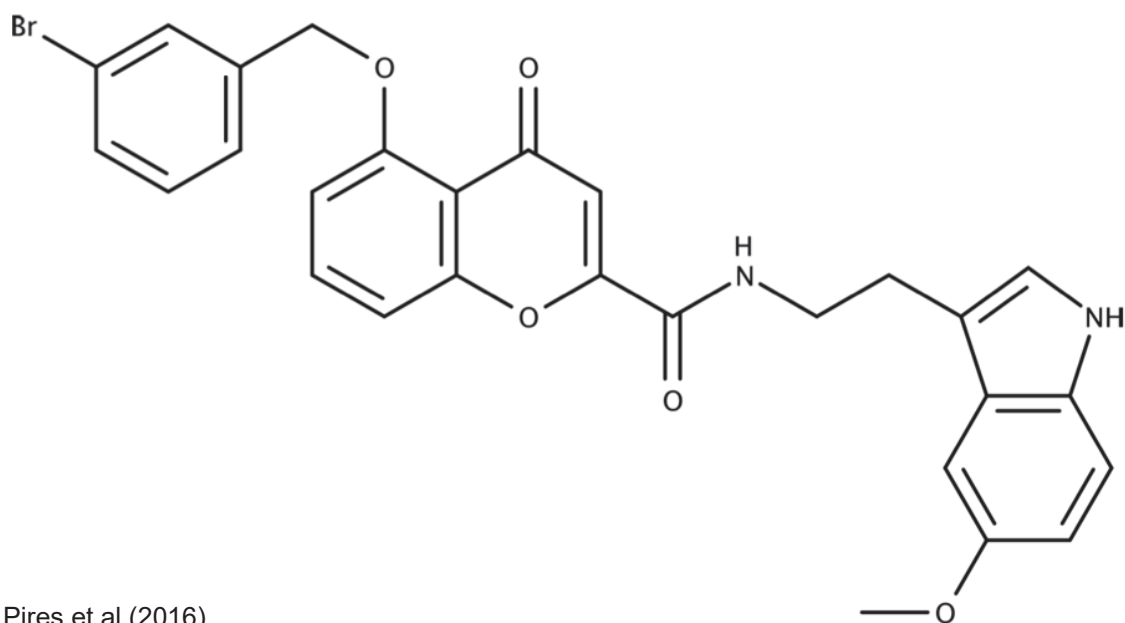


FONTE: Pires et al (2016).

Esse análogo, em decorrência de seu potencial, foi testado em estudos *in vivo*, onde evidenciou-se que seu uso concomitante ao quimioterápico CPT-11 bloqueou o crescimento de tumores recém implantados assim como interrompeu o crescimento de tumores previamente estabelecidos, inibindo o fenótipo resistente em 90% dos casos (PAYEN et al.,2014).

A pesquisa por análogos do MBL-II-141 resultou na descoberta da Cromona 4a (FIGURA 6), um inibidor do transportador ABCG2 três vezes mais potente que o MBL-II-141, de massa molecular 533 g/mol (PIRES et al.,2016). Entretanto, sua insolubilidade em água impede o avanço para ensaios clínicos (VALDAMERI et al., 2012c). Essa diferença extremamente significativa na potência inibitória do composto decorre da posição e do tipo de halógeno ligado no anel aromático, como pode ser observado na figura 5. Ficou evidenciado que a mudança na posição do Bromo no MBL-II-141 sem mudar o ligante resultou nesse aumento significativo na capacidade inibitória (VALDAMERI et al., 2012c).

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA CROMONA 4a.



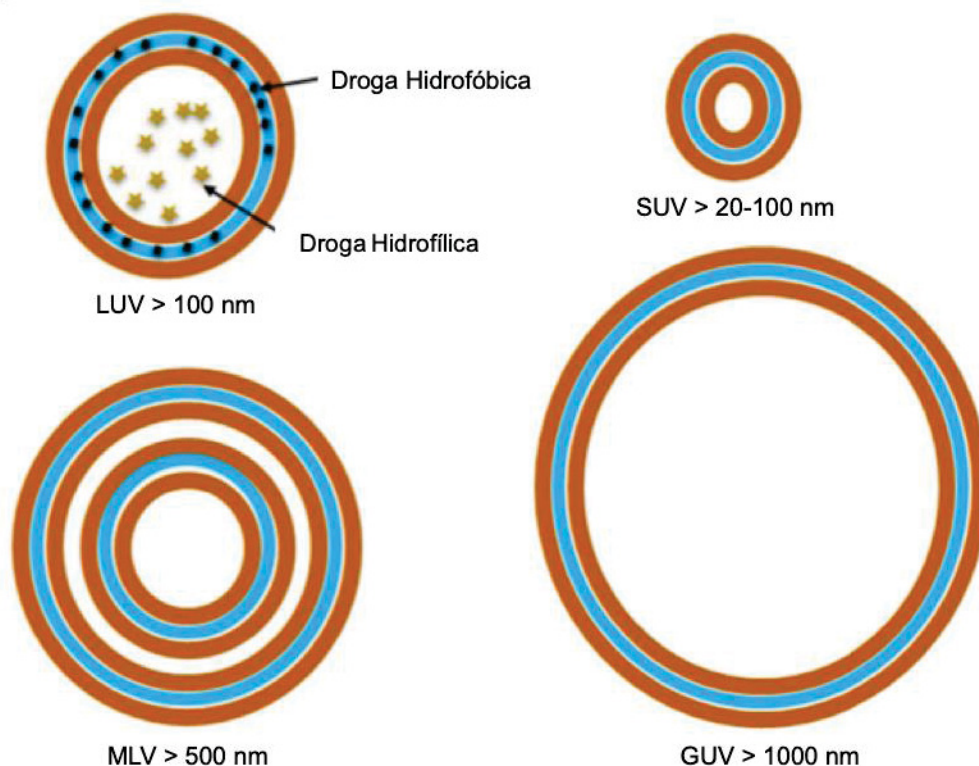
FONTE: Pires et al (2016).

2.6 LIPOSSOMAS

Lipossomas são estruturas esféricas, primeiramente descritas por Banghman na década de 60 e posteriormente estudadas como potenciais veículos para transporte de moléculas visto sua característica anfifílica, constituída por uma bicamada de fosfolipídios, rearranjados de maneira a apresentarem os grupamentos polares voltados para o meio exterior aquoso na camada externa e voltados para o lúmen do lipossoma na camada interna, ficando as caudas carbônicas apolares intercaladas entre essas duas camadas, formando um compartimento apolar (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965; EGBARIA; WEINER, 1990).

Lipossomas podem ser categorizados de acordo com seu tamanho e número de camadas, como pode ser observado na Figura 6.

FIGURA 6 – CLASSIFICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS DE ACORDO COM TAMANHO E NÚMERO DE CAMADAS.



LEGENDA: LUV (*Large unilamellar vesicles*, vesículas grandes de uma camada); SUV (*Small unilamellar vesicles*, vesículas pequenas de uma camada); MLV (*Multilamellar vesicles*, vesículas de múltiplas camadas) e GUV (*Giant unilamellar vesicles*, vesículas gigantes de uma camada). A região laranja representa a porção polar dos fosfolipídeos, a região azul corresponde à porção apolar dos fosfolipídeos. A imagem acima não se encontra em escala.

FONTE: Adaptado de Pattni et al (2015).

Considerando sua característica anfifílica e a capacidade de transportar moléculas polares e apolares, o uso de lipossomas como formulações para o transporte de fármacos representa uma ferramenta poderosa para viabilizar medicações cuja solubilidade determina um impedimento ao uso clínico (VAN BALEN et al.,2004; SOFOU,2007; BUNKER; MAGARKAR; VIITALA,2016; ZYLBERBERG; MATOSEVIC,2016; BULBAKE et al.,2017).

Concomitante à otimização da solubilidade do composto, o encapsulamento de drogas por essa metodologia protege contra degradação química e biológica durante o armazenamento e permite a modificação da superfície pela adição de ligantes, vetorizando a formulação para alvos específicos (SOFOU,2007; TRAN et al.,2009; PATTNI et al.,2015).

O uso bem sucedido de lipossomas como nanoformulações iniciou-se com o Doxil® em 1995 (BARENHOLZ et al.,2012), sendo rapidamente sucedido por outras formulações, abrangendo tanto medicamentos quimioterápicos quanto outras classes medicamentosas, como é o caso do DaunoXome®, Depocyt®, Myocet® (formulações de quimioterápicos), Epaxal®, Inflexal®Y (medicamentos anti-virais), DepoDur™, Exparel® (medicamentos analgésicos) e Abelcet®, Ambisome® e Amphotec® (medicamentos antifúngicos) (BULBAKE et al.,2017).

2.7 MICROVESÍCULAS

São parte de vesículas extracelulares, as quais estão constituídas por exossomas e microvesículas, diferindo em tamanho e biogênese. Exossomas são de 30-100 nm e são formadas a partir de corpúsculos multivesiculares e microvesículas (100 nm ate 1 uM) são formadas a partir da membrana plasmática (RAPOSO; STOORVOGEL,2013; RUFINO-RAMOS et al.,2017).

A liberação de microvesículas ocorre de forma regulada e possibilita à célula de origem transmitir proteínas, micro RNA (miRNA) e RNA mensageiro (RNAm) (MATHIVANAN et al,2010).

O processo de microvesiculação não está completamente esclarecido, entretanto, estudos indicam que a elevação na concentração de cálcio citoplasmático associado ao deslocamento do equilíbrio na simetria dos fosfolipídios da membrana plasmática desempenham papel fundamental nesse processo (RAPOSO; STOORVOGEL,2013).

A elevação do íon Ca^{2+} promove ativação das enzimas scramblase, calpaína e gelsolina, a primeira desempenhando papel no transporte de fosfolipídios e as duas últimas relacionadas com alterações no citoesqueleto e clivagem de filamentos de actina. Concomitante a esses processos, ocorre inativação de translocases que mantêm os fosfolipídios fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina voltados para a camada interna (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI,2009).

Esse processo leva a formação de microvesículas estruturalmente caracterizadas por uma bicamada lipídica constituída por esfingomiéline, fosfatidilserina e outros fosfolipídios. Intercalados com esses fosfolipídios temos proteínas de membrana, de adesão e colesterol (RAPOSO; STORVOGEL,2013) podendo apresentar, inclusive, transportadores ABC, como é o caso descrito de microvesículas derivadas de células de câncer de mama que apresentam transportadores que atuam sequestrando agentes quimioterápicos do meio extracelular para seu interior (IFERGAN; SCHEFFER; ASSARAF,2005; GOLERBARON; ASSARAF,2011).

Considerando a composição e capacidade de transportar seletivamente proteínas, miRNA e RNAm da célula de origem, são muitas as formas de atuação dessas estruturas celulares, que podem receber proteínas, receptores ou revestimentos específicos pelas células de origem para posterior identificação por células-alvo de interesse, apresentam capacidade de fundir com células-alvo levando à expressão de seus constituintes de membrana nessas células ou mesmo a transferência de seu conteúdo, desencadeando uma série de eventos celulares (SILVERMAN et al.; SKOG et al.,2008; GYORGY et al.,2011; TWU et al.,2013).

Esse tipo de comunicação intercelular mediada por microvesículas está presente nos mais distintos organismos, sendo descrito em fungos, plantas, bactérias e animais, o que justifica-se pela elevada versatilidade na transmissão de informações (BARTENEVA; MALTSEV; VOROBEV,2013; BUNGGULAWA et al.,2018). Podem atuar como intermediários em processos fisiológicos, desempenhando papel na coagulação e processos inflamatórios (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI,2009; MATHIVANAN et al.,2010), promovendo mudanças fenotípicas nas células-alvo favorecendo o parasitismo (SILVERMAN et al.; TWU et al.,2013) até transportar oncogenes entre células tumorais agravando o prognóstico (AL-NEDAWI; MEEHAN; RAK,2009).

3 JUSTIFICATIVA

Os transportadores ABC são considerados os principais responsáveis pelo fenômeno de MDR. Em contrapartida, o desenvolvimento de inibidores dos transportadores ABC representa a principal estratégia para sensibilizar células neoplásicas resistentes ao tratamento quimioterápico.

A literatura sugere que o principal transportador ABC responsável pela resistência é a glicoproteína-P, seguido do transportador ABCG2. Testes clínicos utilizando inibidores específicos da glicoproteína-P já foram realizados, mas na maioria dos casos os resultados não foram promissores devido a uma multiplicidade de fatores incluindo a não confirmação de superexpressão de PgP, bem como a possibilidade da quimiorresistência ser decorrente da atividade de outros transportadores ABC, como ABCG2.

Esse fato é atribuído parcialmente a expressão do transportador ABCG2, capaz de transportar uma grande quantidade de quimioterápicos também transportados pela glicoproteína-P. Nessa conjuntura, torna-se muito importante o desenvolvimento de inibidores do transportador ABCG2 para testes clínicos. Diversos compostos demonstraram boa atividade *in vitro* e *in vivo*, apresentando especificidade para o transportador ABCG2 vinculada a um alto potencial inibitório.

O composto pertencente a classe das cromonas, MBL-II-141, foi identificado pelo nosso grupo (VALDAMERI et al., 2012c). Sua atividade inibitória supera o Ko143, considerado o inibidor de referência do transportador ABCG2. O MBL-II-141 apresentou resultados promissores em ensaios *in vitro*, que também foram validados em modelo *in vivo* (HENIN et al., 2017). Contudo, para uso em modelo animal esse composto foi utilizado solubilizado em uma solução de óleo de girassol e DMSO, o que inviabilizaria seu uso na clínica.

Através de uma abordagem de síntese racional foi identificada a cromona 4a, um derivado do MBL-II-141 três vezes mais potente. O desenvolvimento deste análogo, específico para o ABCG2 e isento de citotoxicidade é um passo impactante no combate ao fenômeno MDR mediado pela superexpressão de ABCG2, cujo impedimento reside na solubilidade do composto.

Portanto, existe a necessidade de um sistema de entrega e liberação para superar este problema de solubilidade das cromonas, o que viabilizaria seu uso clínico.

Trata-se, portanto, de uma questão de farmacotécnica, uma vez que existem compostos com ação inibitória comprovada, capazes de reverter o fenótipo de resistência de linhagens transfectadas com o transportador ABCG2, porém restritos aos testes *in vitro* pela limitação da citotoxicidade dos solventes empregados para sua solubilidade.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho apresenta como intuito o desenvolvimento de formulações farmacêuticas de origem biológica (microvesículas de *Giardia intestinalis*) e sintética (lipossomas) para Cromona 4a e testá-las para confirmar a manutenção da atividade farmacológica da Cromona 4a como inibidor do transportador ABCG2.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Incorporar a Cromona 4a em lipossomas, formando a matriz sintética;

Caracterizar a matriz sintética;

Incorporar a Cromona 4a em microvesículas de *Giardia intestinalis*, formando a matriz biológica;

Caracterizar a matriz biológica;

Testar a atividade biológica da Cromona 4a incorporada em lipossomas e microvesículas através de ensaio de inibição do transportador ABCG2;

Testar a atividade biológica da Cromona 4a incorporada em microvesículas e lipossomas através de ensaio de quimiossensibilização em células superexpressando o transportador ABCG2.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES

A Cromona 4a utilizada foi sintetizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. AHCÈNE Boumendjel da Université Grenoble Alpes – França (PIRES et al., 2016). O Ko143 (lote GR3183549-1) e o SN-38 (lote APN 12417-1-1) foram adquiridas da Abcam. Mitoxantrona (lote MKBT1468V) e Hoechst 33342 (lote 1941450) foram adquiridos da Sigma Aldrich e Invitrogen, respectivamente. Todos os reagentes supracitados foram solubilizados em DMSO para produção da solução estoque, que foi armazenada em -20 °C.

O tampão PBS 1x utilizado apresentou a seguinte composição: NaCl 137 mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10,0 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 7,4. Para o cultivo celular o meio DMEM (lote 2060444) e o soro fetal bovino (SFB, lote 2104351), foram adquiridos da Gibco. A anfotericina B (lote 049M4144V) e a solução penicilina/streptomicina (lote 090719T1) foram adquiridas da Invitrogen e LGC Biotecnologia respectivamente.

O G418 (lote 177709), essencial para garantir a seleção da linhagem de HEK393-ABCG2 que superexpressa o transportador ABCG2, foi adquirido da Fisher Bioreagents. O reagente Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT, lote 1967002), utilizado no ensaio de reversão, foi adquirido da Invitrogen e solubilizado em PBS (0,5mg/mL – concentração final).

5.2 LINHAGENS CELULARES

Foi utilizada a linhagem celular de fibroblasto humano HEK293 WT (Célula humana renal embrionária - linhagem selvagem, *Human Embryonic Kidney - wild type*) e a linhagem celular HEK293 transfectada de maneira estável para superexpressar o transportador ABCG2 (HEK293-ABCG2) (VALDAMERI et al., 2012a). As linhagens foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) alta glicose suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina, ambas adquiridas da Sigma Aldrich). As linhagens foram provenientes do *Institut de Biologie et de Chimie des Protéines*, Lyon, França, cedidas gentilmente pelo Dr. Attilio Di Pietro.

5.3 OBTENÇÃO DE LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram obtidos em parceria com o laboratório de Biopolímeros, localizado no campus Politécnico, Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

Sua formação foi realizada partindo dos fosfolipídios DSPC (Diestearoilfosfatidilcolina) e DOPE (Dioleilfosfatidiletanolamina). Foram misturados 20 mg de DSPC, 1,86 mg de DOPE e 5,3 mg de cromona 4a (quantidade correspondente a concentração final de 1 mM para o volume final de 10 mL). O material foi solubilizado em 10 mL de diclorometano em um balão de fundo redondo com junta esmerilhada. Essa solução foi purgada com N₂ por 2 minutos para remoção parcial de O₂. Após essa etapa o balão foi acoplado em um sistema de rotaevaporação até remoção total do solvente volátil, formando um filme na parede do balão volumétrico.

Esse balão foi submerso em banho de óleo a 70°C e recebeu 10 mL de PBS, permanecendo nessas condições por 1 hora com agitação magnética vigorosa. O produto da reação anterior foi sonificado por 3 minutos para dismantelamento de eventuais agregados, homogeneizando o tamanho dos lipossomas formados.

Também foi realizada a formação de “lipossomas vazios”, sem a presença da cromona 4a, com o intuito de serem utilizados como controle experimental.

5.4 OBTENÇÃO DE MICROVESÍCULAS

As microvesículas foram obtidas em parceria com o laboratório Evahpi (*Extracellular Vesicles and Host-Parasite Interactions Research group*), localizado no campus Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

Foram utilizadas microvesículas obtidas de trofozoítos de *Giardia intestinalis*. Os trofozoítos foram cultivados em meio TYI-S-33 em tubo Falcon® de 15 mL, em estufa à 37°C com pressão de CO₂ (5%) até obtenção de densidade de 1,0 x 10⁶ trofozoítos/mL.

O cultivo foi submetido a banho de gelo por pelo menos 15 minutos, em seguida centrifugado a 600 g por 5 minutos em centrifuga refrigerada a 4°C. O

sobrenadante foi descartado e o pellet celular obtido foi ressuspendido em 6 mL de meio TYI-S-33 sem Soro Adulto Bovino.

Realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições. O pellet foi ressuspendido em 6 mL de meio TYI-S-33 sem Soro Adulto Bovino, o cultivo foi suplementado com 1 $\mu\text{L/mL}$ de CaCl_2 1 M e incubado a 37°C por uma hora.

Após a incubação, o cultivo foi centrifugado a 600 g por 5 minutos, e o sobrenadante coletado em microtubos, os quais foram centrifugados a 4.000 g por 30 minutos duas vezes, coletando o sobrenadante e descartando os debris obtidos no pellet.

Essa etapa separa impurezas e debris celulares de maior grau, preparando a amostra para o processo de ultracentrifugação (100.000 g por 1,5 h) necessária para a obtenção das microvesículas purificadas (CESTARI et al.,2012). Após obter as microvesículas, quantificou-se a concentração de proteínas obtida utilizando o *kit* de ensaio de proteína Micro-BCA (*Thermo Scientific*, EUA) conforme descrito pelo fabricante.

Para esse estudo, as microvesículas obtidas eram alíquotadas para obter porções com 4 μg de microvesículas, solubilizadas em PBS e foram incubadas com cromona 4a (solubilizada em DMSO) por 30 minutos. Cada alíquota de microvesícula obtida recebia um volume diferente de cromona 4a, de forma que fossem obtidas as concentrações finais de 0,1; 1,0 e 10,0 μM de cromona 4a. Após o período estipulado de incubação à temperatura ambiente as alíquotas foram submetidas a ultracentrifugação (100.000 g por 1,5 h) para remoção do DMSO, ressuspendendo o pellet obtido em 100 μL de PBS.

O ensaio com a matriz biológica, por questões logísticas, envolveu a necessidade de armazenamento das microvesículas à 4°C, ocorrendo da seguinte forma: após obtenção e quantificação das microvesículas as mesmas foram armazenadas à 4°C até o dia seguinte, quando era realizada a incubação com a cromona 4a e consequente ultracentrifugação para remover o DMSO. Após a ultracentrifugação as microvesículas foram novamente armazenadas à 4°C até o dia seguinte, quando foram realizados os ensaios de inibição e de reversão.

5.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR ABCG2

Células HEK293 *wild type* e células HEK293-ABCG2 foram tripsinizadas e plaqueadas em placa de 24 poços ($2,0 \times 10^5$ células por poço). As células foram incubadas por 48 horas em estufa humidificada a 37°C e com atmosfera de 5% de CO₂.

Após verificação de uma confluência de aproximadamente 90% as células foram lavadas com PBS para remoção do meio e incubadas com a cromona 4a (através da matriz sintética e da matriz biológica) por 1 hora (ensaio clássico) e 24 horas (ensaio adaptado) e, após esse tempo, incubadas por 30 minutos com o substrato hoescht 33342 a 20 nM. Após a incubação, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS aquecido a 37°C e tripsinizadas, sendo ressuspensas em 0,2 mL de PBS gelado e mantidas em gelo em tubo de citometria até o momento da análise por citometria de fluxo, realizada no citômetro FACSCelesta® (laser 355 nm de excitação e leitura em BP450/50 nm para o Hoechst 33342). Foi utilizado o inibidor de referência Ko143 a 0,5 μ M como controle positivo de inibição.

Ao serem aspiradas pelo citômetro, as células passam alinhadas na câmera de fluxo onde são excitadas pela incidência do laser, cujas dispersões frontal (FSC, *Forward Scatter*) e lateral (SSC, *Side Scatter*) fornecem informações sobre tamanho e complexidade respectivamente.

Complementando essas informações, o laser excita os fluorocromos presentes em cada célula que passa, que irão emitir fluorescência em comprimentos de onda característicos, o que é detectado concomitantemente e armazenado eletronicamente como informação característica da célula.

A soma de informações sobre tamanho, complexidade e emissões de fluorescência de cada célula, tanto qualitativamente (se emitiu ou não fluorescência) quanto quantitativamente (intensidade da emissão, proporcional à marcação por anticorpo monoclonal) é característica de cada célula, e a isso chamamos de evento.

Com o intuito de obter uma análise consistente com elevada acurácia, para cada condição armazenamos informação de, no mínimo, 10.000 eventos, ou seja, informação de 10.000 células em cada condição.

Essas condições, para todos os ensaios de inibição realizados, são acompanhadas de 3 controles experimentais: o branco (suspensão celular isenta de qualquer tratamento ou sonda fluorescente, importante para a determinação do gate

celular na análise citométrica e identificação da autofluorescência celular, que deve ser mínima e não impactar na análise), o controle negativo (presença da sonda fluorescente – Hoeschst 33342 – que é substrato do ABCG2, na ausência de inibidores, demonstrando fluorescência maior que o branco porém reduzida quando comparada ao controle positivo, em virtude do efluxo da sonda promovido pela superexpressão do transportador ABCG2) e o controle positivo (presença da sonda fluorescente e de um inibidor de referência em concentração saturante – Ko143 a $0,5 \mu\text{M}$ – que promove a inibição total do ABCG2 impedindo o efluxo da sonda fluorescente e resultando no acúmulo intracelular da mesma, acarretando em uma elevada fluorescência).

No racional do ensaio de inibição citométrico, o controle negativo e o controle positivo representam respectivamente o acúmulo mínimo e máximo de sonda fluorescente, diretamente correlacionados com a inibição do transportador ABCG2, ausente no controle negativo e total no controle positivo. A razão de fluorescência entre os controles deve apresentar um delta, conforme equação demonstrada abaixo. Experimentos que não apresentarem delta são prontamente invalidados, sendo a apresentação de delta um controle experimental importante que evidencia a expressão de transportadores nas linhagens utilizadas no experimento.

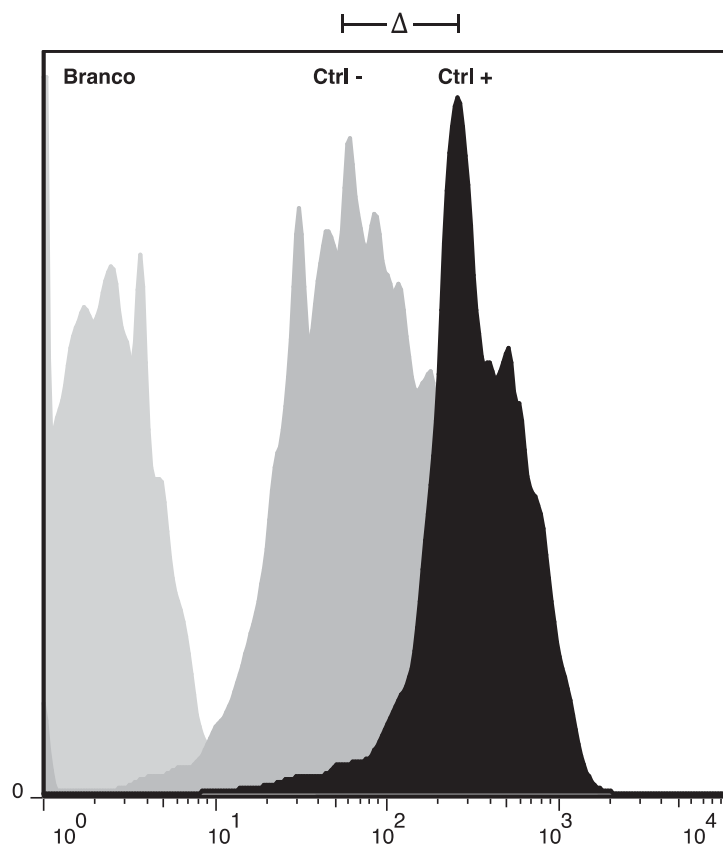
$$\Delta f = \frac{\textit{Fluorescência Controle Positivo}}{\textit{Fluorescência Controle Negativo}}$$

onde:

Δf : Variação de fluorescência.

Na sobreposição ilustrada na Figura 7, podemos verificar a disposição dos picos de fluorescência na leitura do branco (pico A), controle negativo (pico B) e controle positivo (pico C).

FIGURA 7 – SOBREPOSIÇÃO DOS PICOS DE FLUORESCÊNCIA EM UM ENSAIO DE INIBIÇÃO MEDIADOS PELO ACÚMULO DE HOECHST 33342 NAS CONDIÇÕES CONTROLE.

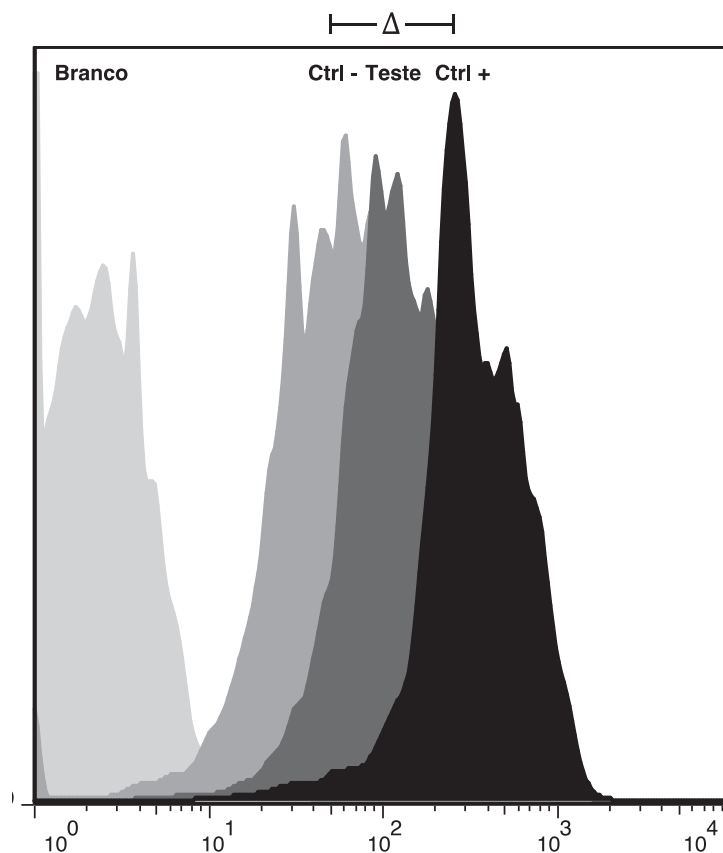


LEGENDA: Sobreposição de histogramas provenientes das fluorescências das condições “Branco”, “Controle negativo” e “Controle positivo”.

FONTE: O autor (2020).

Quando o ensaio apresenta delta de fluorescência entre os controles negativo e positivo validado, realiza-se a leitura das condições teste, cuja expectativa é que apresentem leitura próxima do controle positivo, demonstrando que a formulação testada teve capacidade de inibir o ABCG2, impedir o efluxo da sonda fluorescente e promover o acúmulo dessa no interior celular, conforme exemplo da Figura 8.

FIGURA 8 – SOBREPOSIÇÃO DOS PICOS DE FLUORESCÊNCIA EM UM ENSAIO DE INIBIÇÃO MEDIADOS PELO ACÚMULO DE HOECHST 33342 EM UM ENSAIO.



LEGENDA: Sobreposição de histogramas provenientes das fluorescências das condições “Branco”, “Controle negativo”, “Controle positivo” e do “Teste”. Nesse exemplo ilustrativo de um ensaio de inibição, é possível observar que a situação teste promoveu inibição parcial do transportador ABCG2, ocorrendo acúmulo de Hoechst 33342 no interior celular, promovendo deslocamento do pico de fluorescência dentro do delta em direção ao controle positivo.

FONTE: O autor (2020).

Os resultados apresentados nesse estudo, expressos como percentuais de inibição relativos ao controle positivo (inibidor Ko143 em concentração saturante), foram determinados de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{F_{\text{teste}} - F_{\text{neg}}}{F_{\text{pos}} - F_{\text{neg}}} \right) \times 100$$

onde:

F_{teste} = Mediana de fluorescência apresentada pelas formulações farmacêuticas testadas;

F_{neg} = Mediana de fluorescência apresentada pelo controle negativo;

F_{pos} = Mediana de fluorescência apresentada pelo controle positivo.

5.6 ENSAIO DE REVERSÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA

Células HEK293 WT e células HEK293-ABCG2 foram tripsinizadas e plaqueadas em placa de 96 poços ($2,5 \times 10^4$ células por poço). As células foram incubadas por 24 horas em estufa humidificada a 37°C e com atmosfera de 5% de CO_2 .

Após verificação de uma confluência aproximada de 40%, o meio de cultivo foi removido e as células receberam um tratamento de 72 horas com SN-38 10 nM ou SN-38 10 nM em associação com o inibidor de referência (Ko143 a $0,5 \mu\text{M}$) e SN-38 em associação com as formulações contendo a cromona 4a.

Após o período de tratamento foram adicionados 20 μL de MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) a 5 mg/mL, para obter uma concentração final de 0,5 mg/mL em cada poço. Esse composto é substrato de enzimas desidrogenases mitocondriais presentes nas células viáveis, que reduzem o MTT formando cristais de formazan, em um desenho experimental que permite correlacionar a intensidade da reação com a viabilidade celular.

Após 4 horas de incubação, o meio foi removido e os cristais formados foram solubilizados pela adição de 100 μL de uma solução de DMSO e etanol (1:1). A absorbância foi lida em 570 nm usando um leitor de microplaca (BioRad).

Nesse ensaio correlaciona-se a elevação na absorbância com maior viabilidade celular, significando que durante o tratamento as células apresentaram fenótipo de resistência aos agentes quimioterápicos empregados. Por outro lado, caso o tratamento empregado na reversão do fenótipo de resistência à quimioterapia seja bem sucedido, ocorre morte celular ao longo do tratamento resultando em menor número de células viáveis após 72 horas, havendo menor formação de cristais e conseqüentemente baixa leitura de absorbância. É, portanto, uma leitura indireta por viabilidade celular da reversão do fenótipo de resistência à quimioterapia mediado por transportador ABCG2.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o grande potencial da cromona 4a, duas formulações foram estudadas, ambas livres de solvente orgânico na preparação final, compatível com futuros testes pré-clínicos e clínicos.

6.1 LIPOSSOMAS

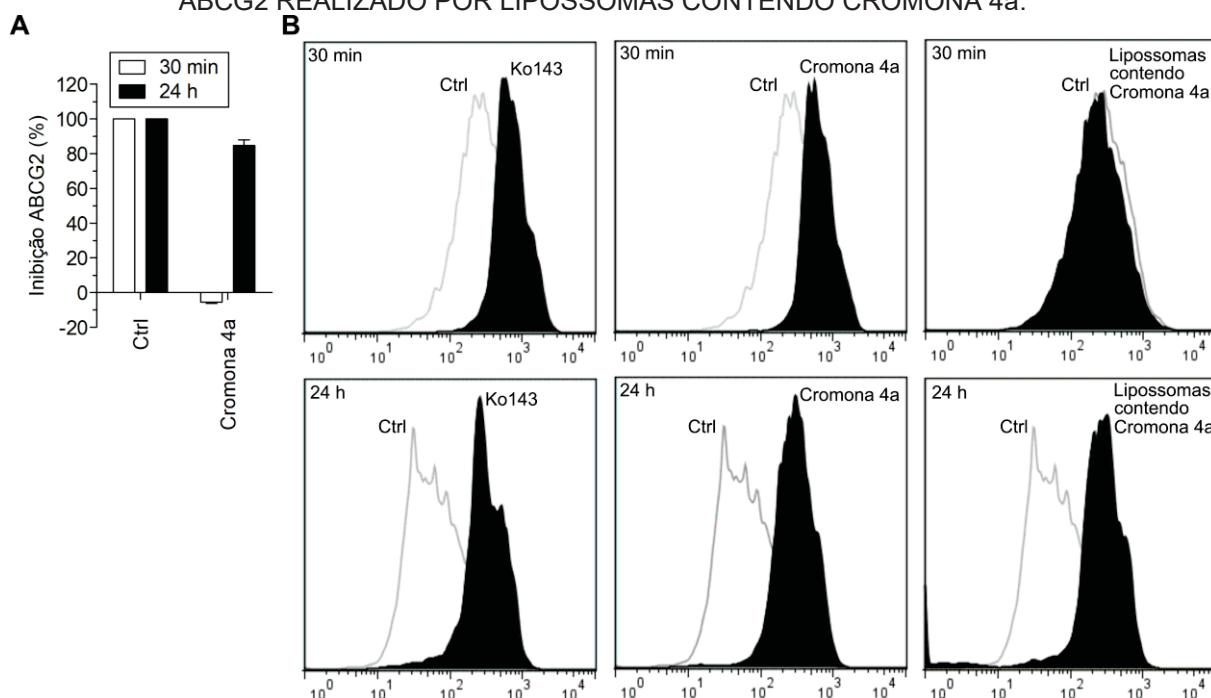
Inicialmente foi realizado uma formulação farmacêutica para cromona 4a em lipossomas. A incorporação de moléculas hidrofóbicas insolúveis em solvente aquoso é uma estratégia clássica, bem descrita e utilizada pela indústria farmacêutica (CORTESE et al.,1999; DUA; RANA; BHANDARI,2012; FAN; ZHANG,2013; ZYLBERBERG; MATOSEVIC,2016). Um exemplo de fármaco que faz uso de lipossomas é a doxorubicina (BARENHOLZ et al., 2012), que possui uma apresentação farmacêutica chamada de doxorubicina lipossomal.

Os lipossomas carregando a cromona 4a foram obtidas partindo dos fosfolipídios DSPC e DOPE. Na ausência de uma metodologia padronizada para a quantificação da cromona 4a, para confirmar que os lipossomas incorporaram a cromona 4a, foi realizado um ensaio de inibição do transportador ABCG2, cujo resultado positivo representaria indiretamente a incorporação da cromona 4a pelos lipossomas. O modelo biológico utilizado foram células da linhagem HEK293 que foram transfectadas de maneira estável para superexpressar o transportador ABCG2. As células foram incubadas com o substrato fluorescente do transportador ABCG2, Hoechst 33342 na ausência e presença de lipossomas contendo a cromona 4a. A fluorescência do Hoechst 33342 foi quantificada por citometria de fluxo.

O teste clássico de identificação de inibidores de transportadores ABC é realizado incubando concomitantemente o substrato do transportador e o inibidor por um período de 30 minutos. Como pode ser observado na Figura 9, lipossomas contendo a cromona 4a não produziram nenhum efeito inibitório. Contudo, quando foi aumentado o tempo de exposição dos lipossomas contendo a cromona 4a por um período de 24 horas, foi observado uma inibição completa do transportador ABCG2. Os resultados sugerem duas possibilidades: (i) a incorporação dos lipossomas pelas células ocorre de maneira lenta, logo o tempo de incubação foi insuficiente para que ocorresse captação celular da matriz sintética ou (ii) a liberação da cromona 4a dos

lipossomas dentro das células ocorre de maneira lenta. Todavia, os resultados obtidos em modelo celular confirmam que os lipossomas incorporaram a cromona 4a e liberaram a molécula dentro das células alvo, observação confirmada pelo acúmulo da sonda fluorescente na ausência de efluxo mediado por ABCG2.

FIGURA 9 – INIBIÇÃO DO EFLUXO DE HOECHST 33342 MEDIADO PELO TRANSPORTADOR ABCG2 REALIZADO POR LIPOSSOMAS CONTENDO CROMONA 4a.



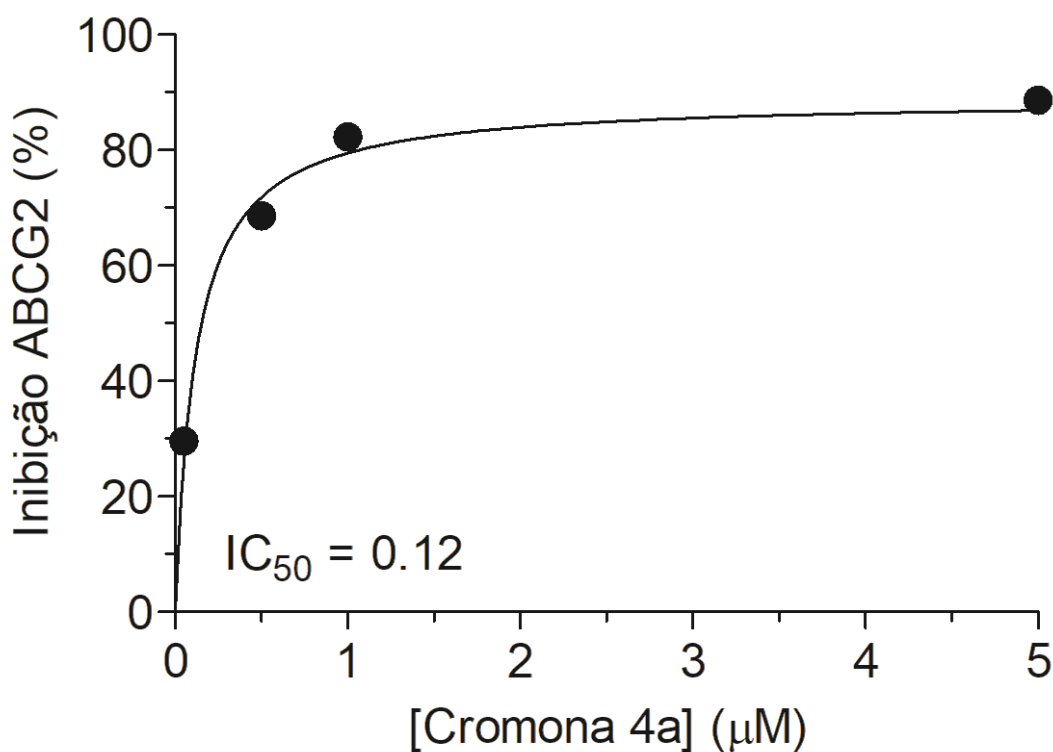
LEGENDA: Nos 3 histogramas superiores, células HEK293-ABCG2 foram expostas concomitantemente com lipossomas contendo 1 μM da cromona 4a e Hoechst 33342 (20 nM) por um período de 30 minutos. Em uma segunda condição, nos 3 histogramas inferiores, as células foram expostas por 24 horas com lipossomas contendo 1 μM da cromona 4a. Durante os últimos 30 minutos de incubação Hoechst 33342 (20 nM) foi adicionado. A porcentagem de inibição foi determinada usando o Ko143 (0,5 μM) como inibidor de referência, capaz de produzir 100% de inibição. Um controle com células HEK293 *wild type* também foi realizado. Os valores de inibição foram calculados a partir dos valores de mediana de fluorescência obtidos por citometria de fluxo, referente ao acúmulo intracelular de Hoechst 33342. (A) Os resultados foram expressos como percentuais de inibição em relação ao controle (Ko143) e representam a média \pm DP de três experimentos independentes. (B) Histogramas representativos da incubação com cromona 4a por 30 min (superiores) e por 24 h (inferiores) provenientes de uma das replicatas experimentais.

FONTE: O autor (2020).

O MBL-II-141 foi descrito apresentando um valor de IC_{50} de inibição, isso é, uma concentração capaz de inibir 50% do transporte mediado por ABCG2, entre 0,11 e 0,26 μM (VALDAMERI et al., 2012b; PAYEN et al., 2014). Durante a identificação da cromona 4a, que apresentou um IC_{50} de inibição de 0,086 μM , o MBL-II-141 foi novamente testado, apresentando um valor de IC_{50} de inibição de 0,26 μM (PIRES et al., 2016).

Para avaliar se a incorporação da cromona 4a nos lipossomas foi realmente eficiente, uma curva de porcentagem de inibição pelo aumento da concentração de cromona 4a foi realizada, para tanto, foi realizada diluição seriada da “solução-mãe” de lipossomas na concentração hipotética de 1mM. Como pode ser observado na figura 10, foi obtido um valor de IC₅₀ de inibição de 0,12 µM, resultado comparável com a cromona 4a solubilizada diretamente no solvente orgânico DMSO que resultou em um IC₅₀ de 0,086 µM (PIRES et al.,2016). Esse resultado confirma o potencial uso de lipossomas para obtenção de uma formulação farmacêutica para a cromona 4a compatível com modelos pré-clínicos e clínicos.

FIGURA 10 – INIBIÇÃO DO EFLUXO DE HOECHST 33342 MEDIADO PELO TRANSPORTADOR ABCG2 REALIZADO POR LIPOSSOMAS CONTENDO CROMONA 4a.



LEGENDA: Células HEK293-ABCG2 foram expostas por 24 horas com lipossomas contendo diferentes concentrações de cromona 4a (0,05, 0,5, 1 e 5 µM). Durante os últimos 30 minutos de incubação, Hoechst 33342 (20 nM) foi adicionado. A porcentagem de inibição foi determinada usando o Ko143 (0,5 µM) como inibidor de referência, capaz de produzir 100% de inibição. Um controle com células HEK293 *wild type* também foi realizado. Os valores de inibição foram calculados a partir dos valores de mediana de fluorescência obtidos por citometria de fluxo, referente ao acúmulo intracelular de Hoechst 33342. Os resultados foram expressos como percentuais de inibição em relação ao controle (Ko143) e representam a média de três experimentos independentes.

FONTE: O autor (2020).

6.2 MICROVESÍCULAS

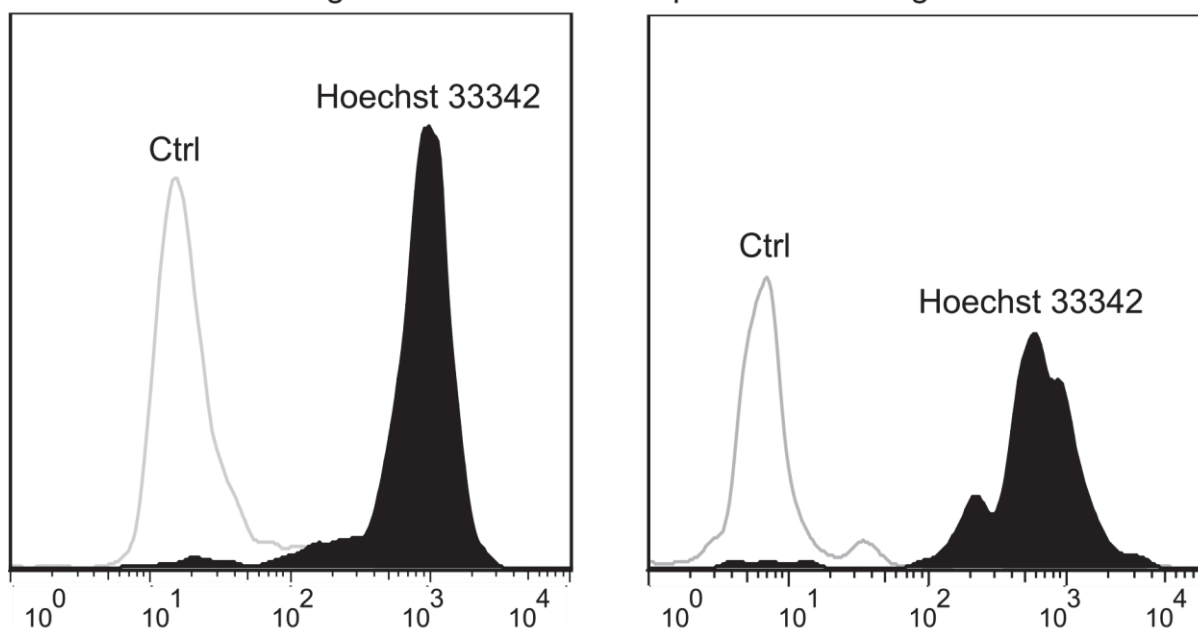
Microvesículas biológicas tem sido aplicadas como carreadores de moléculas, porém pouco foi explorado sobre essa propriedade biotecnológica (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI,2009; RAPOSO; STOORVOGEL,2013; RUFINO-RAMOS et al.,2017; XU et al.,2018). Considerando que lipossomas sintéticos podem apresentar citotoxicidade ou ainda induzir reações imunológicas (BULBAKE et al.,2017), torna-se interessante uma abordagem utilizando matrizes biológicas. Ainda, está bem estabelecido que microvesículas de *Giardia intestinalis* são consideradas um dos melhores modelos biológicos para produção de microvesículas em grande quantidade (EVANS-OSSSES et al.,2017). Nesse contexto, após validação da incorporação e entrega da cromona 4a em sistema de lipossomas, foi avaliado se microvesículas de *Giardia intestinalis* poderiam funcionar da mesma maneira.

A capacidade de microvesículas de incorporar e liberar drogas já é conhecida para diversas aplicações, com o intuito de testar microvesículas como uma matriz biológica para transporte e entrega da cromona 4a, microvesículas extracelulares de *Giardia intestinalis* foram produzidas através de estímulo com cálcio. Após a obtenção dessas microvesículas, em um volume de 100 μ L, metade do volume foi alíquotado e incubado com 3 μ M de Hoechst 33342, uma sonda fluorescente que atravessa membranas biológicas, visando obter uma prova de conceito.

Através de um ensaio de citometria de fluxo foi possível verificar que as microvesículas foram capazes de incorporar completamente a sonda fluorescente, como pode ser evidenciado pelo histograma apresentado na Figura 11. Entretanto, nessa situação o solvente que solubiliza o Hoechst 33342 continua na amostra.

Para remoção completa do solvente orgânico DMSO, após incubação do Hoechst 33342 com as microvesículas, foi realizado uma etapa de ultracentrifugação. O pellet contendo as microvesículas foram então solubilizados em PBS. Após esse processamento foi observado que a sonda fluorescente continua dentro das microvesículas, comprovando a capacidade de incorporação de moléculas por essa matriz biológica (FIGURA 11).

FIGURA 11 – INCORPORAÇÃO DE HOECHST 33342 EM MICROVESÍCULAS DE *Giardia intestinalis*. Antes de ultracentrifugar



LEGENDA: Microvesículas de *Giardia intestinalis* foram alíquotadas e metade foi incubada com Hoechst 33342 (3 μM) por um período de 30 minutos, enquanto a outra metade permaneceu como controle (Ctrl). Foram comparadas duas condições: microvesículas antes e após ultracentrifugação. A fluorescência do Hoechst 33342 dentro das microvesículas foi observada por citometria de fluxo através de duas replicatas experimentais.

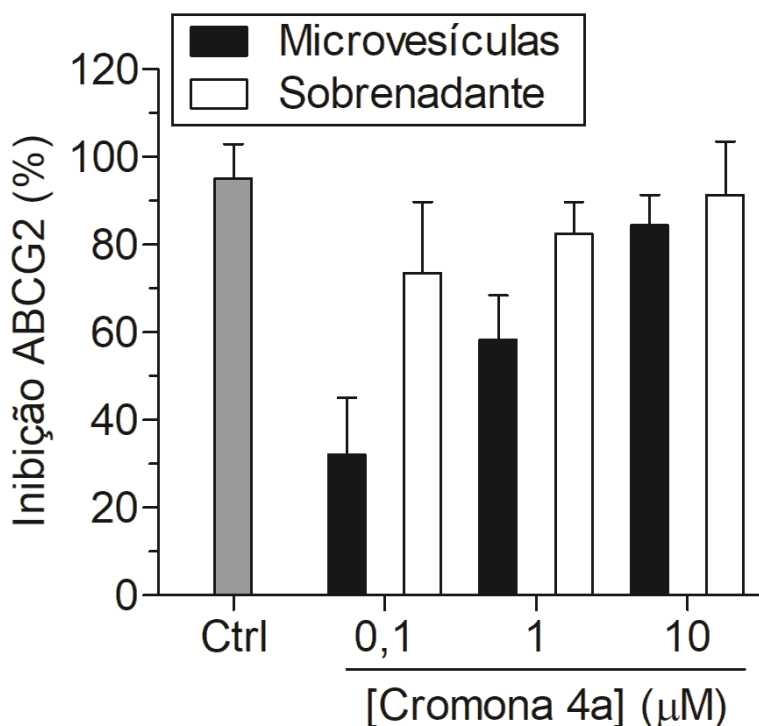
FONTE: O autor (2020).

Após a prova de conceito realizada com a sonda fluorescente, o mesmo procedimento foi realizado incubando diferentes concentrações de cromona 4a. Nesse caso, após a incubação as microvesículas foram ultracentrifugadas para completa remoção do solvente DMSO. Ainda foi avaliado o sobrenadante coletado na etapa de ultracentrifugação e foi utilizado o Ko143 em concentração saturante, como controle experimental representando 100% de inibição.

Os resultados de inibição do transportador ABCG2 com microvesículas contendo a cromona 4a demonstraram que essa matriz biológica é capaz de incorporar o fármaco e entregar rapidamente para as células, uma vez que o ensaio foi realizado incubando as microvesículas por apenas 30 minutos com as células HEK293-ABCG2 (FIGURA 12). Além disso, foi observado um efeito dose dependente para a cromona 4a incorporada nas microvesículas. A determinação da inibição do transporte de ABCG2 pelo sobrenadante da microvesiculação após a incubação com diferentes concentrações de cromona 4a evidenciou que as microvesículas não incorporaram totalmente o fármaco. A inibição de ABCG2 pelos sobrenadantes foi semelhante à inibição pelo Ko143. A incubação com 10 μM de cromona 4a resultou na inibição de ABCG2 tanto com o sobrenadante quanto com as microvesículas de

100% (Figura 12). Esse resultado demonstra que a matriz biológica pode ser utilizada para entrega de fármacos, mesmo em um sistema complexo que é a inibição de transportadores ABC.

FIGURA 12 – INIBIÇÃO DO EFLUXO DE HOECHST 33342 MEDIADO PELO TRANSPORTADOR ABCG2 REALIZADO POR MICROVESÍCULAS CONTENDO CROMONA 4a.



LEGENDA: Células HEK293-ABCG2 foram expostas concomitantemente com microvesículas contendo diferentes concentrações de cromona 4a (0,1, 1, 10 e 50 µM), ou o sobrenadante recuperado da incubação das microvesículas e Hoechst 33342 (20 nM) por um período de 30 minutos. A porcentagem de inibição foi determinada usando o Ko143 (0,5 µM) como inibidor de referência, capaz de produzir 100% de inibição (Ctrl). Os valores de inibição foram calculados a partir dos valores de mediana de fluorescência obtidos por citometria de fluxo, referente ao acúmulo intracelular de Hoechst 33342. Os resultados foram expressos como percentuais de inibição em relação ao controle (Ko143) e representam a média ± DP de três experimentos independentes.

FONTE: O autor (2020).

6.3 ENSAIO DE REVERSÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA MEDIADO POR SUPEREXPRESSÃO DE ABCG2

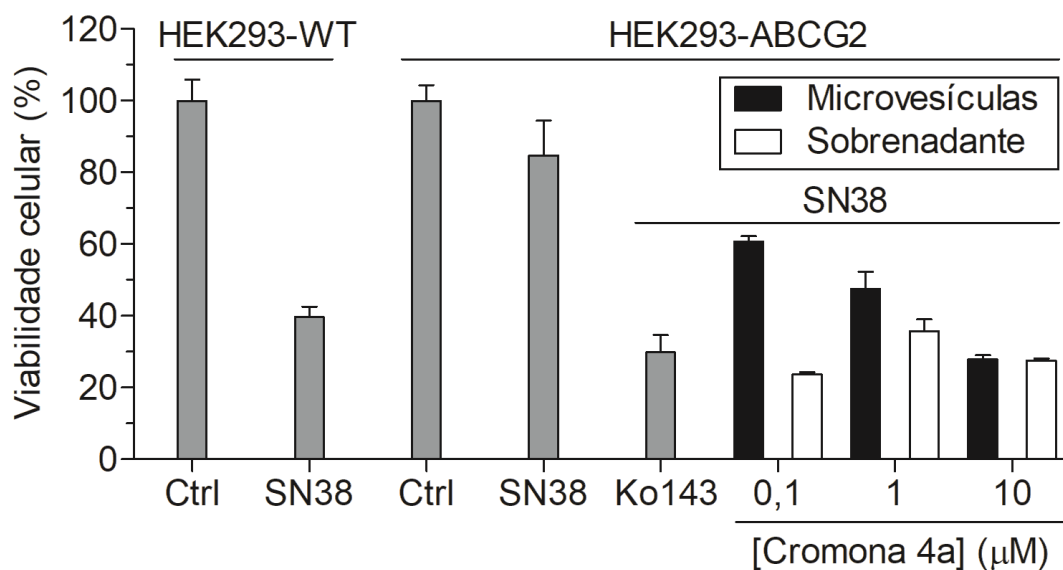
A fim de investigar se a cromona 4a incorporada em microvesículas pode inibir o transportador ABCG2 na membrana celular, foram utilizadas concentrações não tóxicas de cromona 4a e combinadas com um substrato químico do transportador, o SN-38, no par de células parental (*wild type*) e superexpressando ABCG2. A cromona 4a pode ser considerada um composto não tóxico, não apresentando citotoxicidade em concentrações de até 100 μM (PIRES et al.,2016).

Os ensaios de inibição por citometria de fluxo são normalmente realizados em um período curto de incubação com o substrato e inibidor, sendo 30 minutos o tempo padronizado de ensaio. Para validar se o efeito de inibição se sustenta por longos períodos, uma abordagem considerada padrão ouro é avaliar a reversão da resistência através de ensaios de viabilidade celular por um período de 72 horas comparando o efeito em células *wild type* e que superexpressam o transportador de interesse, nesse caso ABCG2, na presença de substrato e inibidor (ROBEY et al.,2018).

O SN-38 é o metabólito ativo e citotóxico do quimioterápico irinotecan e ambos são substratos de ABCG2. Os fibroblastos imortalizados não são capazes de metabolizar o irinotecano produzindo seu metabólito ativo. Por isso, para o ensaio de viabilidade, o SN-38 tem que ser utilizado como substrato. As células foram tratadas com 10 nM de SN-38 por 72 horas, comparando a ausência do inibidor e a presença da cromona 4a, presente nas microvesículas ou no sobrenadante obtido na etapa de ultracentrifugação.

Como pode ser observado na figura 13, as microvesículas contendo a cromona 4a foram capazes de reverter o fenótipo de resistência em células superexpressando o transportador ABCG2. O efeito observado com microvesículas foi dose dependente, enquanto que já na menor concentração foi observada uma reversão completa quando foi usado o sobrenadante (Figura 13). Esse resultado sugeriu a validação do uso de microvesículas como formulação farmacêutica de inibidores de transportadores ABC.

FIGURA 13 – REVERSÃO DA RESISTÊNCIA AO SN-38 MEDIADA PELO TRANSPORTADOR ABCG2 REALIZADO POR MICROVESÍCULAS CONTENDO CROMONA 4a.



LEGENDA: Ensaio de viabilidade celular nas células tratadas somente com o substrato ou em combinação com diferentes concentrações do inibidor na matriz biológica. Células HEK293-ABCG2 e HEK293-WT foram expostas a SN-38 (condições teste) e também houve condições não expostas (controle). Células HEK293-ABCG2 foram expostas a SN-38 (10 nM) sozinho ou combinado com microvesículas contendo diferentes concentrações de cromona 4a (1, 10 e 50 μM), ou com os sobrenadantes recuperados da incubação das microvesículas por um período de 72 horas. Células HEK293-WT foram expostas a SN-38 (10nM) e cultivadas sem tratamento como condição controle (Ctrl), para demonstrar a efetividade do SN38 na redução da viabilidade celular. A porcentagem de células viáveis foi comparada as condições controle (ausência de tratamento) e exposição so SN-38 sozinho. Os resultados foram expressos como percentuais de células viáveis em relação ao controle sem tratamento e representam a média ± DP de três experimentos independentes.

FONTE: O autor (2020).

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos representam um grande avanço no uso de inibidores do transportador ABCG2, pois demonstraram, pela primeira vez, o desenvolvimento e aplicação de formulações farmacêuticas com partículas baseadas em lipídeos como sistema de liberação de inibidor de transportadores ABC. Demonstramos a capacidade da matriz biológica e da matriz sintética de incorporar a cromona 4a, transportá-la até as células e liberarem a cromona 4a, evidenciado pelo efeito desse composto na inibição do transportador ABCG2 presente nas linhagens transfectadas.

A formulação com lipossomas é compatível com uso clínico (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES,2007) e foi efetiva para um potente inibidor seletivo do transportador ABCG2, a cromona 4a. A formulação farmacêutica baseada em lipossomas pode ser escalonada possibilitando futuros testes *in vivo* (BULBAKE et al.,2017). Tanto a matriz sintética quanto a matriz biológica necessitam passar por um processo de caracterização.

O uso de microvesículas obtidas através de uma matriz biológica como carreadores de inibidores de transportadores ABC foi realizado como prova de conceito, uma vez que futuramente essa é uma abordagem que pode ser extrapolada com a utilização de vesículas extracelulares do próprio receptor (BALACHANDRAN; YUANA, 2019). Essas células seriam estimuladas em laboratório para produção de microvesículas, que seriam incubadas com os fármacos e então devolvidas ao paciente. Esse sistema teria dois impactos para área farmacêutica: (i) esse é um sistema 100% compatível com o receptor e (ii) permite o reaproveitamento e síntese racional de drogas hidrofóbicas solúveis apenas em solventes orgânicos (WANG et al.,2013). Apesar dessa importante prova de conceito, essas hipóteses ainda precisam ser validadas.

REFERÊNCIAS

- AL-NEDAWI, K.; MEEHAN, B.; RAK, J. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. **Cell Cycle**, v. 8, n. 13, p.2014-8, 2009.
- ALLEN, J. D. *et al.* Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. **Mol Cancer Ther**, v. 1, n. 6, p.417-25, 2002.
- ALLIKMETS, R. *et al.* A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. **Cancer Res**, v. 58, n. 23, p.5337-9, 1998.
- AMBUDKAR, S. V. *et al.* P-glycoprotein: from genomics to mechanism. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p.7468-85, 2003.
- ARNAUD, O. *et al.* The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan. **Eur J Cancer**, v. 47, n. 4, p.640-8, 2011.
- BAILEY-DELL, K. J. *et al.* Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. **Biochim Biophys Acta**, v. 1520, n. 3, p.234-41, 2001.
- BALACHANDRAN, B.; YUANA, Y. Extracellular vesicles-based drug delivery system for cancer treatment. **Cogent Medicine**, v. 6, n. 1635806, p.1-23, 2019.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J Mol Biol**, v. 13, n. 1, p.238-52, 1965.
- BARENHOLZ, Y. Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **J Control Release**, v. 160, n. 2, p.117-34, 2012.
- BARTENEVA, N. S.; MALTSEV, N.; VOROBEV, I. A. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, p.49, 2013.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p.167-79, 2007.
- BOUMENDJEL, A. *et al.* Acridone derivatives: design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. **Bioorg Med Chem**, v. 15, n. 8, p.2892-7, 2007.
- BOUMENDJEL, A. *et al.* Targeting the multidrug ABCG2 transporter with flavonoidic inhibitors: in vitro optimization and in vivo validation. **Curr Med Chem**, v. 18, n. 22, p.3387-401, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estatísticas de câncer: Causas e prevenção. INCA, 2020.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p.394-424, 2018.

BULBAKE, U. *et al.* Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 2, 2017.

BUNGGULAWA, E. J. *et al.* Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. **J Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p.81, 2018.

BUNKER, A.; MAGARKAR, A.; VIITALA, T. Rational design of liposomal drug delivery systems, a review: Combined experimental and computational studies of lipid membranes, liposomes and their PEGylation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1858, n. 10, p.2334-2352, 2016.

BURKE, M. A.; ARDEHALI, H. Mitochondrial ATP-binding cassette proteins. **Translational Research**, v. 150, n. 2, p.73-80, 2007.

CESTARI, I. *et al.* Trypanosoma cruzi immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. **J Immunol**, v. 188, n. 4, p.1942-52, 2012.

CHAPUY, B. *et al.* Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. **Leukemia**, v. 22, n. 8, p.1576-86, 2008.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biol**, v. 19, n. 2, p.43-51, 2009.

CORTESI, R. *et al.* Preparation of liposomes by reverse-phase evaporation using alternative organic solvents. **J Microencapsul**, v. 16, n. 2, p.251-6, 1999.

DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **J Lipid Res**, v. 42, n. 7, p.1007-17, 2001.

DEELEY, R. G.; WESTLAKE, C.; COLE, S. P. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. **Physiol Rev**, v. 86, n. 3, p.849-99, 2006.

DOYLE, L. A. *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 26, p.15665-70, 1998.

DUA, J. S.; RANA, A. C.; BHANDARI, A. K. LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, v. 3, n. 2, p.14-20, 2012.

EGBARIA, K.; WEINER, N. Liposomes as a topical drug delivery system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 5, p.287-300, 1990.

EVANS-OSES, I. *et al.* Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response in vitro. **European Journal of Cell Biology**, v. 96, n. 2, p.131-142, 2017.

FAN, Y.; ZHANG, Q. Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. **Asian Journal of pharmaceutical sciences**, v. 8, p.81-7, 2013.

FLETCHER, J. I. *et al.* ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 2, p.147-56, 2010.

FLETCHER, J. I. *et al.* ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. **Drug Resist Updat**, v. 26, p.1-9, 2016.

GLAVINAS, H. *et al.* The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. **Curr Drug Deliv**, v. 1, n. 1, p.27-42, 2004.

GOLER-BARON, V.; ASSARAF, Y. G. Structure and function of ABCG2-rich extracellular vesicles mediating multidrug resistance. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p.e16007, 2011.

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annu Rev Med**, v. 53, p.615-27, 2002.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat Rev 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 Des Devel Ther**, v. 9, p.3481-95, 2015.

GYORGY, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 16, p.2667-88, 2011.

HENIN, E. *et al.* Pharmacokinetic interactions in mice between irinotecan and MBL-II-141, an ABCG2 inhibitor. **Biopharm Drug Dispos**, v. 38, n. 5, p.351-362, 2017.

IARC: **International Agency for Research on Cancer**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 15/11/2019.

IFERGAN, I.; SCHEFFER, G. L.; ASSARAF, Y. G. Novel extracellular vesicles mediate an ABCG2-dependent anticancer drug sequestration and resistance. **Cancer Res**, v. 65, n. 23, p.10952-8, 2005.

ISHIKAWA, T.; AW, W.; KANEKO, K. Metabolic Interactions of Purine Derivatives with Human ABC Transporter ABCG2: Genetic Testing to Assess Gout Risk. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 6, n. 11, p.1347-60, 2013.

JABOR GOZZI, G. *et al.* Converting potent indeno[1,2-b]indole inhibitors of protein kinase CK2 into selective inhibitors of the breast cancer resistance protein ABCG2. **J Med Chem**, v. 58, n. 1, p.265-77, 2015.

JACKSON, S. M. *et al.* Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2. **Nat Struct Mol Biol**, v. 25, n. 4, p.333-340, 2018.

JONKER, J. W. *et al.* Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 20, p.1651-6, 2000.

KASHIWAYAMA, Y. *et al.* 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH₂-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins. **Exp Cell Res**, v. 315, n. 2, p.190-205, 2009.

KATHAWALA, R. J. *et al.* The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. **Drug Resist Updat**, v. 18, n., p.1-17, 2015.

KHUNWEERAPHONG, N.; STOCKNER, T.; KUCHLER, K. The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p.13767, 2017.

LECERF-SCHMIDT, F. *et al.* ABCG2: recent discovery of potent and highly selective inhibitors. **Future Med Chem**, v. 5, n. 9, p.1037-45, 2013.

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **J Proteomics**, v. 73, n. 10, p.1907-20, 2010.

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

MO, W.; ZHANG, J. T. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. **Int J Biochem Mol Biol**, v. 3, n. 1, p.1-27, 2012.

MOHAMMAD, I. S.; HE, W.; YIN, L. Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR. **Biomed Pharmacother**, v. 100, p.335-348, 2018.

NEMCOVA-FURSTOVA, V. *et al.* Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 310, p.215-228, 2016.

OZVEGY-LACZKA, C. *et al.* Function-dependent conformational changes of the ABCG2 multidrug transporter modify its interaction with a monoclonal antibody on the cell surface. **J Biol Chem**, v. 280, n. 6, p.4219-27, 2005.

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chem Rev**, v. 115, n. 19, p.10938-66, 2015.

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, p.11957-70, 2014.

PIRES, A. *et al.* New, highly potent and non-toxic, chromone inhibitors of the human breast cancer resistance protein ABCG2. **Eur J Med Chem**, v. 122, p.291-301, 2016.

RABINDRAN, S. K. *et al.* Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. **Cancer Res**, v. 60, n. 1, p.47-50, 2000.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, v. 200, n. 4, p.373-83, 2013.

ROBEY, R. W. *et al.* A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2). **Biochim Biophys Acta**, v. 1512, n. 2, p.171-82, 2001.

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

ROBEY, R. W. *et al.* ABCG2: a perspective. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 61, n. 1, p.3-13, 2009.

RUFINO-RAMOS, D. *et al.* Extracellular vesicles: Novel promising delivery systems for therapy of brain diseases. **J Control Release**, v. 262, p.247-258, 2017.

SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 55, n. 1, p.3-29, 2003.

SHAROM, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. **Pharmacogenomics**, v. 9, n. 1, p.105-27, 2008.

SILVERMAN, J. M. *et al.* An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages. **Journal of cell science**, v. 123, p.842-52.

SKOG, J. *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 12, p.1470-6, 2008.

SODANI, K. *et al.* Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. **Chin J Cancer**, v. 31, n. 2, p.58-72, 2012.

SOFUO, S. Surface-active liposomes for targeted cancer therapy. **Nanomedicine (Lond)**, v. 2, n. 5, p.711-24, 2007.

SZAKACS, G. *et al.* Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. **Cancer Cell**, v. 6, n. 2, p.129-37, 2004.

SZAKACS, G. *et al.* The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). **Drug Discov Today**, v. 13, n. 9-10, p.379-93, 2008.

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

TRAN, M. A.; WATTS, R. J.; ROBERTSON, G. P. Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 22, n. 4, p.388-99, 2009.

TWU, O. *et al.* Trichomonas vaginalis exosomes deliver cargo to host cells and mediate host-parasite interactions. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 7, p.e1003482, 2013.

VALDAMERI, G.; GAUTHIER, C. *et al.* Investigation of chalcones as selective inhibitors of the breast cancer resistance protein: critical role of methoxylation in both inhibition potency and cytotoxicity. **J Med Chem**, v. 55, n. 7, p.3193-200, 2012a.

VALDAMERI, G.; GENOUX-BASTIDE, E.; GAUTHIER, C.; GUITTON, J. *et al.* Substituted chromones as highly potent nontoxic inhibitors, specific for the breast cancer resistance protein. **J Med Chem**, v. 55, n. 2, p.966-70, 2012b.

VALDAMERI, G.; GENOUX-BASTIDE, E.; GAUTHIER, C.; PERES, B. *et al.* 6-halogenochromones bearing tryptamine: one-step access to potent and highly selective inhibitors of breast cancer resistance protein. **ChemMedChem**, v. 7, n. 7, p.1177-80, 2012c.

VALDAMERI, G.; RANGEL, L. P. *et al.* Methoxy stilbenes as potent, specific, untransported, and noncytotoxic inhibitors of breast cancer resistance protein. **ACS Chem Biol**, v. 7, n. 2, p.322-30, 2012d.

VAN BALEN, G. P. *et al.* Liposome/water lipophilicity: methods, information content, and pharmaceutical applications. **Med Res Rev**, v. 24, n. 3, p.299-324, 2004.

VAN LOEVEZIJN, A. *et al.* Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 11, n. 1, p.29-32, 2001.

WANG, L. Y. *et al.* Versatile RBC-derived vesicles as nanoparticle vector of photosensitizers for photodynamic therapy. **Nanoscale**, v. 5, n. 1, p.416-21, 2013.

WANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. **Cancer Drug Resist**, v. 2, p.141-60, 2019.

WEEN, M. P. *et al.* The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 96, n. 2, p.220-56, 2015.

WEINSTEIN, R. S. *et al.* Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. **Cancer Res**, v. 51, n. 10, p.2720-6, 1991.

XU, R. *et al.* Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 15, n. 10, p.617-638, 2018.

YOH, K. *et al.* Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 5, p.1691-7, 2004.

ZYLBERBERG, C.; MATOSEVIC, S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. **Drug Deliv**, v. 23, n. 9, p.3319-3329, 2016.