

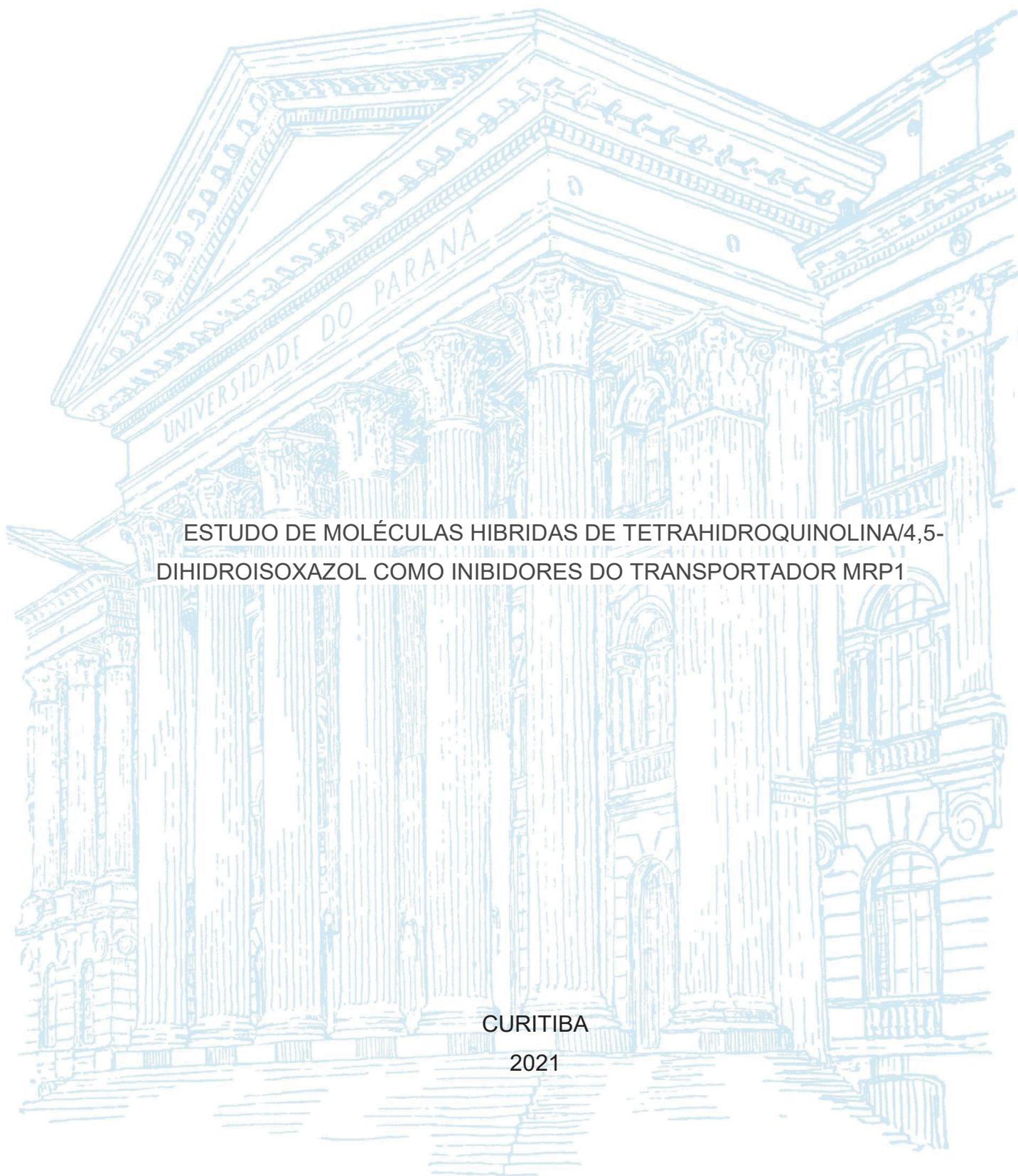
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIOVANA DA SILVA PEREIRA

ESTUDO DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE TETRAHIDROQUINOLINA/4,5-DI-HIDROISOXAZOL COMO INIBIDORES DO TRANSPORTADOR MRP1

CURITIBA

2021



GIOVANA DA SILVA PEREIRA

ESTUDO DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE TETRAHIDROQUINOLINA/4,5-
DIHIDROISOXAZOL COMO INIBIDORES DO TRANSPORTADOR MRP1

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Saúde, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Glaucio Valdameri

Coorientadora: Prof^a. Dra. Vivian Rotuno Moure
Valdameri

CURITIBA

2021

Pereira, Giovana da Silva

Estudo de moléculas híbridas de tetrahydroquinolina/4,5-dihidroisoxazol como inibidores do transportador MRP1 [recurso eletrônico] / Giovana da Silva Pereira – Curitiba, 2021.

1 arquivo (67 p.):PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Glaucio Valdameri

Coorientadora: Profa. Dra. Vivian Rotuno Moure Valdameri

1. Resistência à múltiplas drogas (MRD). 2. Transportadores ABC. 3. Fármacos antineoplásicos. I. Valdameri, Glaucio. II. Valdameri, Vivian Rotune Moure. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1901

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
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 **GIOVANA DA SILVA PEREIRA** intitulada: **Estudo de moléculas híbridas de tetrahydroquinolina/4,5-dihidroisoxazol como inibidores do transportador MRP1**, sob orientação do Prof. Dr. GLAUCIO VALDAMERI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de 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 Julho de 2021.

Assinatura Eletrônica 11/08/2021

14:15:37.0 GLAUCIO

VALDAMERI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 10/08/2021

17:00:14.0 THALES

KRONENBERGER

Avaliador Externo (UNIVERSITY OF TüBINGEN)

Assinatura Eletrônica 12/08/2021

15:58:28.0

STELIA CAROLINA MENDEZ SANCHEZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER)

Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná – Brasil

CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4098 - E-mail: cfufpr@gmail.com

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

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 105811

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 105811

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Ari (in memorian) e Maria (in memorian), por sempre incentivarem meus estudos e por todo amor incondicional.

À minha família por todo o incentivo e muitas vezes abdicarem de seu tempo em prol da realização das suas filhas.

Ao meu namorado, Italo, pelo carinho e apoio em todos os momentos e por sempre acreditar em mim.

Aos meus amigos por todo o apoio e incentivo nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Sou grata à Deus por me proporcionar caminhos para que eu pudesse seguir o meu sonho na pesquisa e tornar realidade tudo que eu sempre imaginei. Por me manter de pé e seguindo em frente após minhas duas maiores perdas na família.

Aos meus pais e familiares próximos por sempre me ampararem com amor e carinho nos momentos felizes e nos de tristeza e desespero, por me proporcionarem uma base rica em educação e por me apoiarem nas minhas escolhas.

Ao meu namorado, por sempre acreditar em mim e apoiar minhas decisões, por sempre estar disposto a passar pelas situações comigo e me amparando com muito carinho em todos os momentos difíceis em que passei.

Aos meus orientadores e equipe do laboratório pelo alto astral de sempre alegando todos os dias de experimentos, desde os mais tranquilos aos mais pesados em que passávamos horas no laboratório.

Ao Gustavo, aluno de Iniciação Científica do laboratório, que foi responsável pela parte de *docking* molecular a qual foi de extrema importância para este trabalho.

Aos meus queridos amigos que me acompanharam da graduação e muitos que fiz enquanto estava no mestrado, por todas as risadas e incentivo.

À UFPR e ao PPGCF pela oportunidade de estudar em uma das melhores universidades públicas do país.

À CAPES pela contemplação da minha bolsa de mestrado. Esse projeto não seria possível se não fosse realizado em tempo integral.

À Fundação Araucária e ao CNPq pelo suporte financeiro ao projeto.

“Crê em ti mesmo, age e verás os resultados. Quando te
esforças, a vida também se esforça para te ajudar.”

Chico Xavier

RESUMO

O câncer é uma questão de saúde pública a nível mundial. Um dos principais desafios do tratamento do câncer é a resistência multidrogas (MDR), causada por vários fatores, incluindo a superexpressão de transportadores de ABC. Estas proteínas transmembrana atuam como bombas de efluxo expelindo o quimioterápico para fora das células. Os três principais transportadores ABC são a glicoproteína P (P-gp), codificada por *ABCB1*, MRP1 (proteína de resistência multidrogas 1), codificada por *ABCC1*, e BCRP (proteína de resistência ao câncer de mama), codificada por *ABCG2*. A estratégia mais promissora para superar a MDR mediada pelos transportadores ABC é o uso de inibidores. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar novos inibidores da MRP1. Foi realizado um *screening* com 16 derivados de tetrahydroquinolina/4,5-dihidroisoxazoles (A1 - D4). Esses compostos foram avaliados como inibidores de MRP1 em células transfectadas de maneira estável, superexpressando o transportador MRP1 (BHK21-MRP1). A linhagem celular parental (BHK-21) foi utilizada como controle. Em relação à capacidade de inibir o efluxo mediado por MRP1, os compostos A1 e D1 apresentaram os melhores resultados (IC_{50} de 0,58 e 2,74 μ M, respectivamente). Além disso, ambos os inibidores apresentaram baixa citotoxicidade e não foram transportados por MRP1. Considerando a razão terapêutica (RT) (citotoxicidade/inibição), o composto A1 foi o mais promissor, mostrando um RT superior a 170, considerado um indicativo positivo para estudos posteriores. Uma análise de *docking* molecular revelou o local de ligação de MRP1 com esses inibidores, o qual é diferente do substrato calceína. Estes dados foram confirmados pela inibição não competitiva. Finalmente, A1 e D1 confirmaram a capacidade da inibição uma vez que melhoraram o efeito dos quimioterápicos (etoposídeo e daunorubicina) em células que superexpressam MRP1. Juntos, esses resultados demonstraram o potencial do composto A1 em seguir em estudos pré-clínicos.

Palavras-chave: resistência à múltiplas drogas (MDR); transportadores ABC; MRP1; inibidores; tetrahydroquinolinas/4,5-dihidroisoxazoles.

ABSTRACT

Cancer is a public health issue worldwide. One of the major challenges of cancer treatment is the multidrug resistance (MDR), caused by several factors, including the overexpression of ABC transporters. These transmembrane proteins act as efflux pumps expelling the chemotherapy outside of cells. The three main ABC transporters are P-glycoprotein (P-gp), encoded by *ABCB1*, MRP1 (multidrug resistance protein 1), encoded by *ABCC1*, and BCRP (breast cancer resistance protein), encoded by *ABCG2*. The most promising strategy to overcome MDR mediated by ABC transporters is the use of inhibitors. Thus, the goal of this study was to identify and characterize new inhibitors of MRP1. A screening with 16 tetrahydroquinoline/4,5-dihydroisoxazole derivatives (A1 - D4) was performed. These compounds were evaluated as MRP1 inhibitors in stably transfected cells overexpressing MRP1 (BHK21-MRP1). The parental cell line (BHK-21) was used as a control. Regarding the ability to inhibit the efflux mediated by MRP1, compounds A1 and D1 showed the best results (IC_{50} of 0.58 and 2.74 μ M, respectively). In addition, both inhibitors showed low cytotoxicity and were not transported by MRP1. Considering the therapeutic ratio (TR) (cytotoxicity/inhibition), compound A1 was the most promising, showing a TR higher than 170, considered a positive indicative for further studies. A molecular docking analysis revealed the MRP1 binding site for these inhibitors, that is different from the substrate calcein. This data was confirmed by the non-competitive inhibition. Finally, A1 and D1 confirmed the inhibition ability since they improved the effect of chemotherapeutics (etoposide and daunorubicin) in cells overexpressing MRP1. Together, these results demonstrated the potential of A1 to follow in pre-clinical studies.

Keywords: multidrug resistance (MDR); ABC transporters; MRP1; inhibitors; tetrahydroquinoline/4,5-dihydroisoxazole derivatives.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2020 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA*	11
FIGURA 2 - CAPACIDADES ADQUIRIDAS DO CÂNCER	12
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DAS SUBFAMÍLIAS DOS TRANSPORTADORES ABC.....	17
FIGURA 4 - EXEMPLO DE FUNCIONAMENTO DE UMA CELULA SUPEREXPRESSANDO TRANSPORTADOR ABC	18
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DOMÍNIOS DO TRANSPORTADOR MRP1	20
FIGURA 6 - TOPOLOGIA DOS TRANSPORTADORES ABCC (MRPs).....	21
FIGURA 7 – ESTRUTURA DOS COMPOSTOS	35
FIGURA 8 – INIBIÇÃO DO EFLUXO DE CALCEÍNA MEDIADO PELO TRANSPORTADOR MRP1 REALIZADO PELOS DERIVADOS DE TETRAHIDROQUINOLINAS/4,5-DI-HIDROISOXAZOLES.....	36
FIGURA 9 - CURVAS DE INIBIÇÃO DE MRP1 PARA DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE IC ₅₀	38
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	40
FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DO EFLUXO DOS COMPOSTOS A1 E D1 NO ENSAIO DE LAVAGEM.....	42
FIGURA 12 - DOCKING MOLECULAR DOS COMPOSTOS A1 E D1 NO TRANSPORTADOR MRP1	45
FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR MRP1 PELO COMPOSTO A1.....	46
FIGURA 14 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS A1 E D1 NA REVERSÃO DA RESISTÊNCIA REALIZADA PELO TRANSPORTADOR MRP1. .	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS	14
TABELA 2 – PROPRIEDADES DOS TRANSPORTADORES ABC.	21
TABELA 3 – DROGAS ANTINEOPLÁSICAS CITOTÓXICAS QUE SÃO SUBSTRATOS DO TRANSPORTADOR MRP1	22
TABELA 4 – INIBIÇÃO DOS TRANSPORTADORES MRP1	24
TABELA 5 – ESTRUTURA DOS COMPOSTOS E SEUS DIFERENTES SUBSTITUINTES.....	27
TABELA 6 – VALORES DE IC ₅₀ , IG ₅₀ E RAZÃO TERAPÊUTICA DOS COMPOSTOS A1 E D1.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3	OBJETIVOS	28
3.1.1	Objetivo Geral.....	28
3.1.2	Objetivos Específicos	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5	RESULTADOS	34
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	52
8	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um conjunto de doenças que se caracteriza pelo crescimento e proliferação desordenada de células que invadem tecidos e órgãos. Por conta da sua rápida proliferação, essas células são muito agressivas e formam tumores, os quais podem se espalhar pelo organismo humano (INCA 2019).

Essa doença surge normalmente devido a um erro genético, uma mutação. Os genes envolvidos nesse processo são denominados de proto-oncogenes, que em um primeiro momento são inativos nas células normais, mas quando transformam as células normais em neoplásicas, processo chamado de transformação maligna, os proto-oncogenes tornam-se oncogenes (INCA 2019).

O câncer é um problema de saúde pública e representa em torno de 12% dos óbitos por ano no Brasil (INCA 2019). No Brasil, os tipos de tumores mais comuns em homens são o de próstata, pulmão, estômago, esôfago, cólon e reto. Nas mulheres, os tipos de tumores mais comuns são o de mama, colo uterino, pulmão, estômago, cólon e reto (GUERRA et al. 2005).

O fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR) é um dos maiores desafios para o tratamento do câncer baseado no uso de quimioterapia. Essa resistência pode ser atribuída a diversos fatores, principalmente pela superexpressão de transportadores ABC, que são proteínas de membrana que atuam como bombas de efluxo, reduzindo a concentração intracelular do quimioterápico a níveis subclínicos (ROBEY et al. 2018).

Atualmente diversos laboratórios de pesquisa trabalham na identificação de inibidores dos três principais transportadores ABC, que são a glicoproteína P (P-gp), codificada pelo gene *ABCB1*; MRP1 (*Multidrug Resistance-associated Protein 1*), codificada pelo gene *ABCC1* e ABCG2, também conhecida como BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*), codificada pelo gene *ABCG2* (JOHNSON; CHEN 2017; TAYLOR et al. 2017).

O estudo em tela identificou e caracterizou o mecanismo de uma nova classe de compostos como inibidores do transportador MRP1, os híbridos moleculares de tetrahydroquinolina/4,5-dihidroisoxazol.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer é uma doença com vários fatores de risco, como tabagismo, doenças crônicas pré-existentes, obesidade, alcoolismo, sedentarismo, entre outras comorbidades (BRAY et al 2018).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) faz estimativas da incidência da doença de três em três anos para o Brasil. A última edição das estimativas foi publicada em 2019, e espera-se que nesse triênio (2020-2022) aconteçam 625 mil novos casos de câncer. A figura 1 apresenta os dez tipos de câncer mais frequentes que variam de acordo com o sexo. Na população feminina, o tipo de câncer mais incidente é o de mama (29,7%), seguido pelo de cólon e reto (9,2%) e colo do útero (7,4%). Na população masculina, o tipo de câncer mais incidente é o de próstata (29,2%), seguido pelo de cólon e reto (9,1%) e traqueia, brônquio e pulmão (7,9%) (INCA 2019).

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%	Homens		Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	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	5.220	2,3%
			Mulheres				

FONTE: Adaptado (INCA 2019).

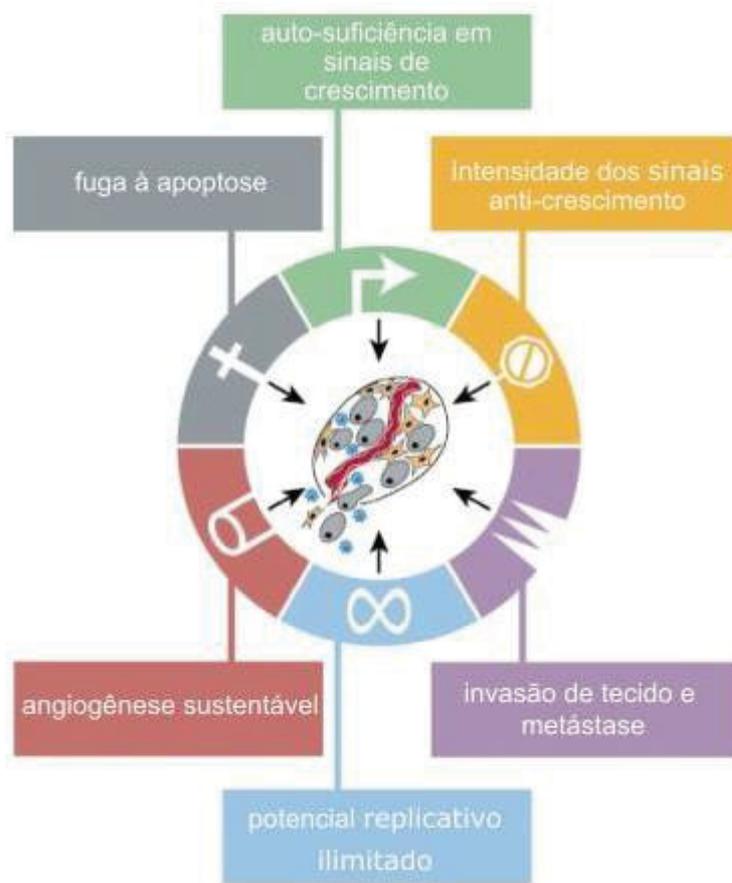
* Números arredondados para múltiplos de 10.

Em uma célula normal, as proteínas envolvidas com o ciclo celular trabalham de forma orquestrada para regular a proliferação e homeostase celular. Entretanto, após o processo de transformação maligna, as células neoplásicas apresentam defeitos nesses mecanismos regulatórios (HANAHAN & WEINBERG 2000). O

câncer é uma doença muito abrangente e complexa, que conta com mais de 100 tipos, podendo acometer diversos órgãos. Essa heterogeneidade dificulta o claro entendimento sobre o funcionamento celular e os mecanismos moleculares apresentados em células neoplásicas (HANAHAN & WEINBERG 2000).

De acordo com o “*The Hallmarks of Cancer*” (HANAHAN & WEINBERG 2000), representado na figura 2, existem seis alterações que podem ser relacionadas com o crescimento das células malignas, a citar: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de inibição do crescimento (anti-crescimento), evasão de morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão de tecido e metástases. Essas seis habilidades podem estar presentes em todos os tipos de câncer, ou senão, em sua maioria.

FIGURA 2 - CAPACIDADES ADQUIRIDAS DO CÂNCER



Fonte: Adaptado de HANAHAN, 2000.

2.2 TRATAMENTO DO CÂNCER

O problema limitante do tratamento do câncer é a MDR, sendo considerado o maior obstáculo para tratar e contornar a doença (KCIUK 2020). Assim, torna-se necessário um maior entendimento dos mecanismos de resistência em câncer para desenvolver novas estratégias de tratamento (CHERN 2020).

Mesmo com inúmeros avanços na medicina, a quimioterapia clássica ainda é a primeira linha de tratamento para o câncer, principalmente em tumores metastáticos (KCIUK 2020). Já a cirurgia e a radioterapia são as estratégias mais efetivas em tratamento de tumores não metastáticos (PEREZ-HERRERO 2015).

Dentro da quimioterapia convencional existem várias classes de quimioterápicos que irão inibir o crescimento e alguns processos celulares e podem ser classificados em:

- a) Agentes alquilantes: irão atuar quimicamente com o DNA causando alterações em suas cadeias e assim impedindo a replicação (RIUL 1999).
- b) Agentes hormonais: como são moduladores de proliferação celular acabam por não ser citotóxicos e tem o objetivo de deter o crescimento tumoral (RIUL 1999).
- c) Produtos vegetais: são produtos naturais citotóxicos (RIUL 1999), dentre eles destacam-se os alcalóides vegetais que são compostos nitrogenados derivados de aminoácidos. Como exemplos temos os alcalóides da vinca, taxóis e epipodofilotoxinas (DE ALMEIDA et al. 2005).
- d) Nitrosuréias: possuem ação similar aos alquilantes e tem propriedades lipossolúveis (RIUL 1999).
- e) Antimetabólitos: tem sua ação bloqueando a síntese do DNA (DE ALMEIDA et al. 2005).
- f) Triazeno: atua através da alquilação do DNA (DE ALMEIDA et al. 2005).
- g) Compostos de platina: atuam na alquilação do DNA e inibindo seletivamente a síntese do mesmo (DE ALMEIDA et al. 2005).
- h) Antibióticos: tem sua ação interferindo na síntese de ácidos nucleicos (RIUL 1999).

Na tabela 1 está representado os exemplos de fármacos de cada classe de quimioterápicos.

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

Classe de quimioterápicos	Exemplos de fármacos
Agentes alquilantes	Ciclofosfamida, clorambucila, ifosfamida, melfalano, carmustina, fotemustina, lomustina, bussulfano, dacarbazina.
Antimetabólitos	Metotrexato, raltitrexato, capecitabina, citarabina, 5-fluorouracila, gencitabina, cladribina, fludarabina, mercaptopurina, tioguanina.
Compostos de platina	Carboplatina, cisplatina, oxaliplatina.
Antibióticos	Bleomicina, doxorubicina, daunorrubicina, dactinomicina, epirubicina, idarrubicina, mitomicina.
Produtos vegetais	Vincristina, vimblastina, etoposídeo, teniposídeo.
Hormônios e análogos	Dexametasona, prednisona, tamoxifeno.
Agentes diversos	Aminoglutetimida, asparaginase, tretinoína, procarbazona, interferona α e β , interleucina-2.

FONTE: Adaptado de MARTINS 2004.

Na escolha de qual terapia utilizar, deve-se ter muito cuidado com relação aos benefícios e aos riscos de cada escolha, principalmente em seus efeitos colaterais (PARTRIDGE 2001).

As drogas quimioterápicas, além de atuar em células neoplásicas, também acabam inibindo o rápido crescimento de células da medula óssea, células do trato gastrointestinal, o que leva a efeitos colaterais desagradáveis (PEREZ-HERRERO 2015). Por conta da toxicidade, a diminuição da qualidade de vida do paciente é uma consequência importante a ser considerada (LINKS 1999).

Ao longo dos últimos 15 anos e com o avanço dos conhecimentos em biologia molecular, o conceito de tratamento ao câncer também evoluiu. Foi necessário o desenvolvimento de novas terapias moleculares para que a seleção de tratamento pudesse ser alterada (ZUGAZAGOITIA 2016). E isso foi possível por conta de novas tecnologias capazes de avaliar o perfil molecular do tumor e com isso a descoberta de marcadores moleculares. Esse avanço pode ser enquadrado na oncologia de precisão, que visa personalizar terapias para anormalidades genômicas em diferentes tipos de tumor (ZUGAZAGOITIA 2016).

Essa terapia de alvo molecular abrange o uso de drogas ou de outras substâncias que possuem um alvo específico. Para ter um desenvolvimento de sucesso é necessário que se tenha a identificação de marcadores ideais, visto que uma das bases para a ocorrência do câncer é a alteração do perfil genético que leva a suscetíveis mutações ou mudanças em proteínas e receptores que promovem a sobrevivência e proliferação das células (LEE 2019; PADMA 2015).

A biologia molecular entra no suporte de prover ferramentas quantitativas e qualitativas para a análise dos ácidos nucleicos celulares e podem detectar alterações malignas em células tumorais. Agem como biomarcadores tumorais e poderão ser usados a fim de diagnóstico e prognóstico, contribuindo para a seleção de tratamento e monitoramento que irá ser adotado pelo paciente (CASTRO SANTANNA 2018).

Distingue-se as células cancerosas das células normais pelas alterações genéticas. É necessário entender as características dos marcadores moleculares específicos para câncer. Essa terapia deve incluir fatores de crescimento, moléculas sinalizadoras, proteínas do ciclo celular, moduladores de apoptose e moléculas que promovem angiogênese e dentre outros fatores (LEE 2018). Agem na superfície celular dos antígenos, fatores de crescimento, receptores ou vias de transdução de sinais que regulam o ciclo de progressão celular, morte celular, metástase e angiogênese. Podem ser classificadas em moléculas pequenas, anticorpos monoclonais, vacinas imunoterápicas e terapia de gene (PADMA 2015).

2.3 RESISTÊNCIA INTRÍNSECA E ADQUIRIDA

Existem dois tipos de resistência às drogas, a intrínseca e a adquirida. A primeira existe antes do tratamento e a segunda depois (WANG 2019). É importante salientar que ambos os mecanismos podem existir desde a progressão da doença até o tratamento. Outro fator chave é que a resistência às múltiplas drogas pode ser diferente da resistência intrínseca previamente existente na célula tumoral, por isso é fundamental o acompanhamento clínico e até mesmo análises genômicas que devem ser feitas antes de um tratamento ser iniciado (WANG 2019).

A resistência intrínseca ou primária representa uma situação clínica em que as células tumorais não respondem à quimioterapia (BAI 2020). Os fatores intrínsecos incluem expressão ou repressão de genes e vias das células tumorais que previnem infiltração imune com o microambiente do tumor (SHARMA 2017).

Entretanto, a resistência adquirida leva à progressão do câncer por mais que tenha uma resposta inicial parcial, resultado do envolvimento de vários mecanismos (RIETH 2018).

2.4 RESISTÊNCIA À MÚLTIPLAS DROGAS (MDR)

O tratamento mais efetivo para os tumores metastáticos é a quimioterapia, porém as células tumorais possuem uma habilidade de se tornarem resistentes às drogas utilizadas, o que impede o sucesso do tratamento quimioterápico (GOTTESMAN 2002). A MDR ocorre quando uma célula de câncer que responderia normalmente a um determinado medicamento antineoplásico torna-se resistente a este, de modo que a combinação de drogas começa a ser usada, contudo, a resistência adquirida a um determinado agente acarreta a resistência cruzada a outros fármacos, por isso o nome de múltiplas drogas (WEN LI, 2016).

A MDR é atualmente descrita como o maior obstáculo na terapia farmacológica do câncer (HENRICH et al. 2009). Esse fenômeno pode ser ocasionado por diferentes mecanismos celulares, a citar: defeitos na regulação gênica de controle de apoptose, alterações no reparo de danos ao DNA, alterações nas enzimas alvo, entrada de drogas através da membrana plasmática e superexpressão de proteínas exportadoras de drogas (RUMJANEK et al. 2001; HUBER et al. 2010).

Um dos mecanismos mais frequentes e importantes de MDR se dá por conta da redução no acúmulo intracelular dos fármacos (PAREDES LARIO et al. 2006), resultado de um ativo efluxo de drogas para fora das células (MIYAKE 1999). Esse mecanismo é decorrente da expressão de bombas de efluxo ATP dependentes, mais conhecida como transportadores ABC (WAGHRAY & ZHANG 2019). A superexpressão desses transportadores resulta no efluxo de uma grande variedade de drogas quimioterápicas (ADAR 2012).

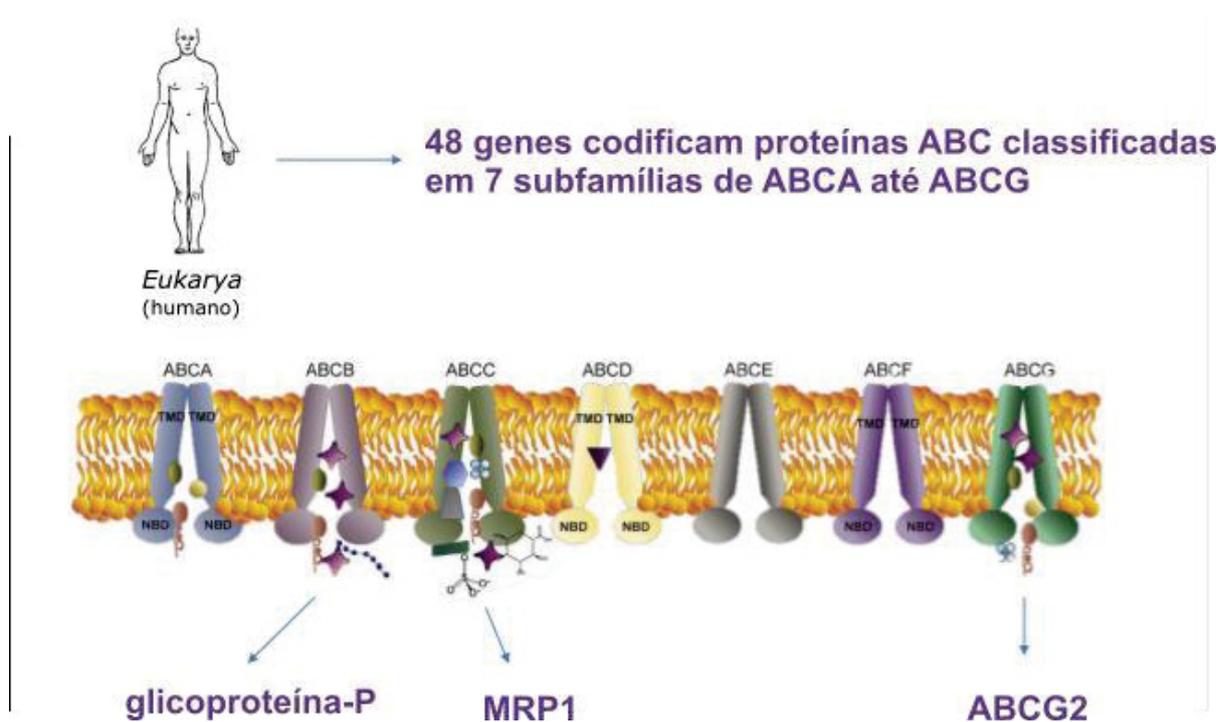
2.5 TRANSPORTADORES ABC

Em humanos, os transportadores ABC promovem o efluxo de ligantes chamados de substratos, na sua maioria quimioterápicos. O transporte para o meio extracelular ocorre às custas da ligação e hidrólise de ATP, resultando em uma

diminuição no acúmulo intracelular do medicamento, principal característica observada no fenótipo de MDR (MOHAMMAD 2018; ROBEY 2008).

Como representado na figura 3, o genoma humano codifica 48 proteínas ABC, na sua grande maioria transportadores, localizados na membrana celular. As proteínas ABC são divididas em sete subfamílias (A-G). São três os principais transportadores ABC implicados clinicamente na resistência a quimioterapia: glicoproteína-P (P-gp), codificada pelo gene *ABCB1*, proteína associada a resistência à múltiplas drogas (MRP1), codificada pelo gene *ABCC1*, e proteína resistente ao câncer de mama (BCRP), codificada pelo gene *ABCG2* (MOHAMMAD 2018; JOHNSON CHEN 2017; TAYLOR et al. 2017).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DAS SUBFAMÍLIAS DOS TRANSPORTADORES ABC

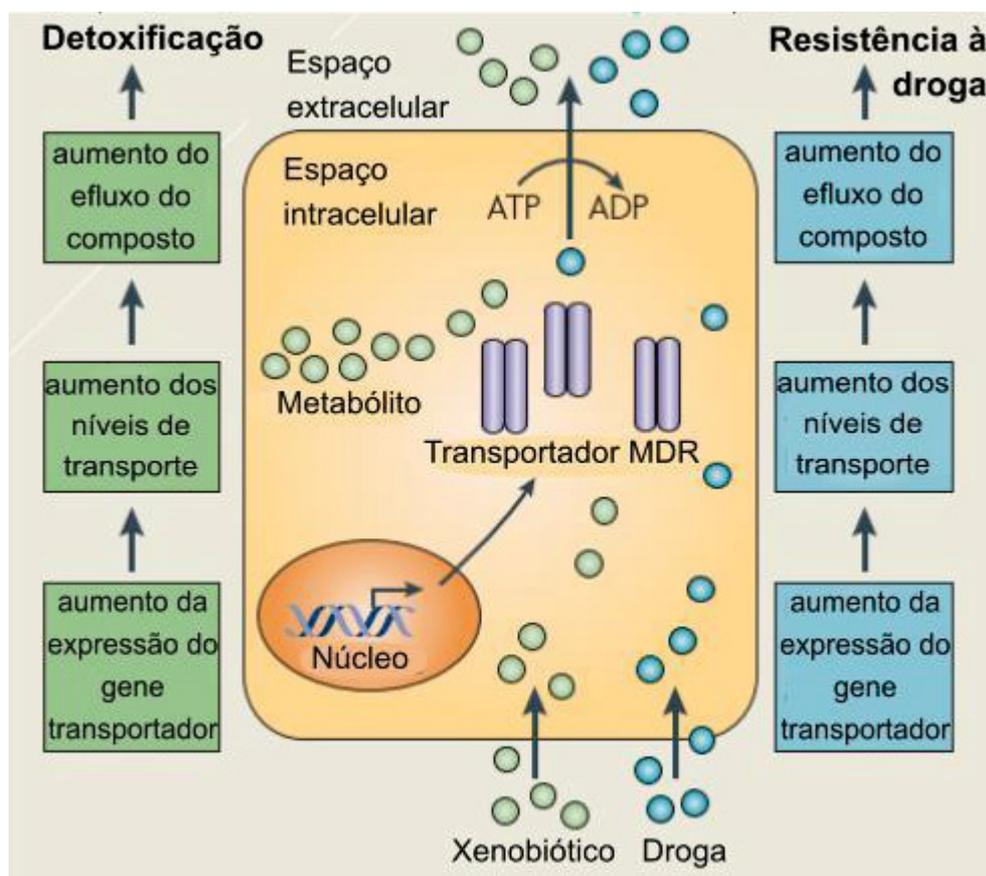


FONTE: Adaptado (SZAKÁCS et al., 2019)

2.5.1 PAPEL DOS TRANSPORTADORES ABC NA RESISTÊNCIA ÀS MÚLTIPLAS DROGAS (MDR)

O efluxo de substratos mediado pelos transportadores ABC, sejam eles endógenos ou fármacos, é realizado pela ligação e hidrólise de ATP, como representado na figura 4. A figura exemplifica tanto o papel fisiológico dos transportadores ABC quanto seu papel na resistência ao tratamento do câncer (GRUBER 2018).

FIGURA 4 - EXEMPLO DE FUNCIONAMENTO DE UMA CELULA SUPEREXPRESSANDO TRANSPORTADOR ABC



Fonte: Adaptado de FLETCHER 2010.

A principal abordagem utilizada para reverter a resistência mediada por transportadores ABC é o uso de inibidores. O uso de inibidores de transportadores ABC já chegou a fase clínica para a P-gp, ao contrário dos outros transportadores

ABC, como MRP1 e ABCG2, que os estudos ainda seguem em fase inicial ou apenas em testes pré-clínicos em modelo animal (ROBEY 2018).

O transportador ABC mais conhecido é a P-gp (XUE 2017), pois foi o primeiro a ter sido descoberto e é o mais estudado dentre os outros transportadores (EL-ARABY 2017). Inúmeros inibidores deste transportador já foram descritos na literatura e testes clínicos já foram conduzidos com inibidores classificados como de primeira à terceira geração. Contudo, a busca de inibidores ainda mais potentes e mais toleráveis pelo organismo continua (ZEINO et al. 2015).

Um dos maiores aprendizados até a presente data, referente dos estudos clínicos com inibidores da P-gp, é que a inibição de apenas um transportador ABC provavelmente não é suficiente para reverter o processo de resistência a quimioterapia (TAMAKI 2011). Assim, um enorme esforço foi dedicado ao desenvolvimento de inibidores para os outros transportadores ABC, incluindo ABCG2 e MRP1.

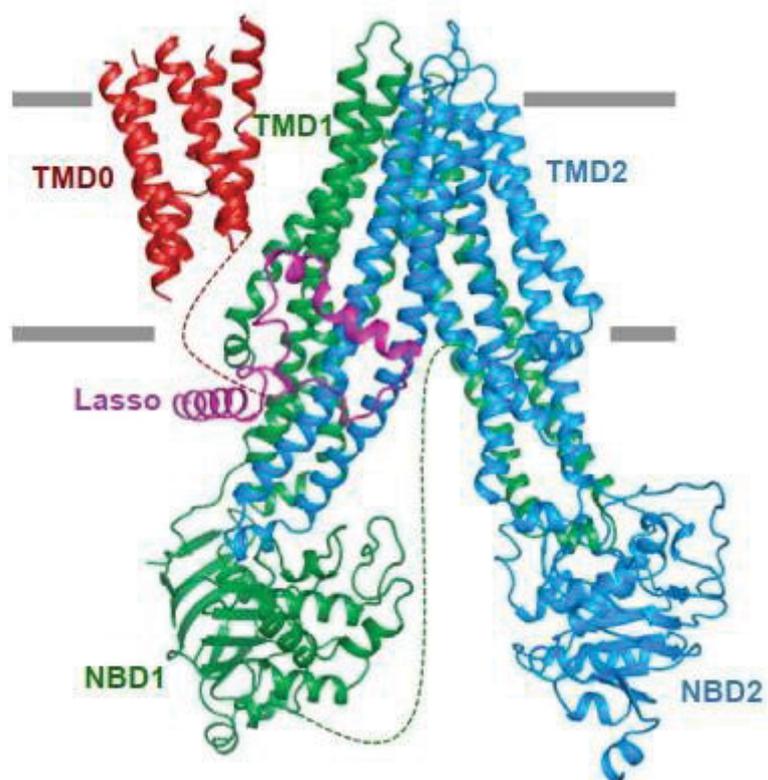
2.6 MRP1

A maior subfamília de transportadores ABC é a subfamília ABCC, também conhecida como proteínas de resistência a múltiplas drogas, MRP (ABCC1-12) (WEEN 2015). A subfamília ABCC (MRPs) é amplamente distribuída em tecidos humanos normais, e os níveis mais altos são encontrados nos testículos, músculo esquelético, coração, rim e pulmão (TERASHI 2000).

O transportador MRP1, codificado pelo gene *ABCC1*, localizado no cromossomo 16p13.1, foi identificado pela primeira vez a partir da linhagem celular NSCLC humana MDR H69/ADR. MRP1 tem o peso molecular de 190 kDa e é composto por três domínios transmembranas e dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBDs), localizados no citoplasma (figura 5).

MRP1 é capaz de transportar um amplo espectro de substratos, incluindo drogas anticâncer conjugadas com glutathione, glucuronato e sulfato, como no caso da vincristina e doxorrubicina (ZHENG 2009). Estudos *in vitro* usando vesículas de membrana de células mostraram que MRP1 parece transportar um amplo espectro de substratos aniônicos, como dissulfeto de glutathione, 17 β -estradiol 17-(β -D-glucuronide) e derivados de sal biliar (TERASHI 2000).

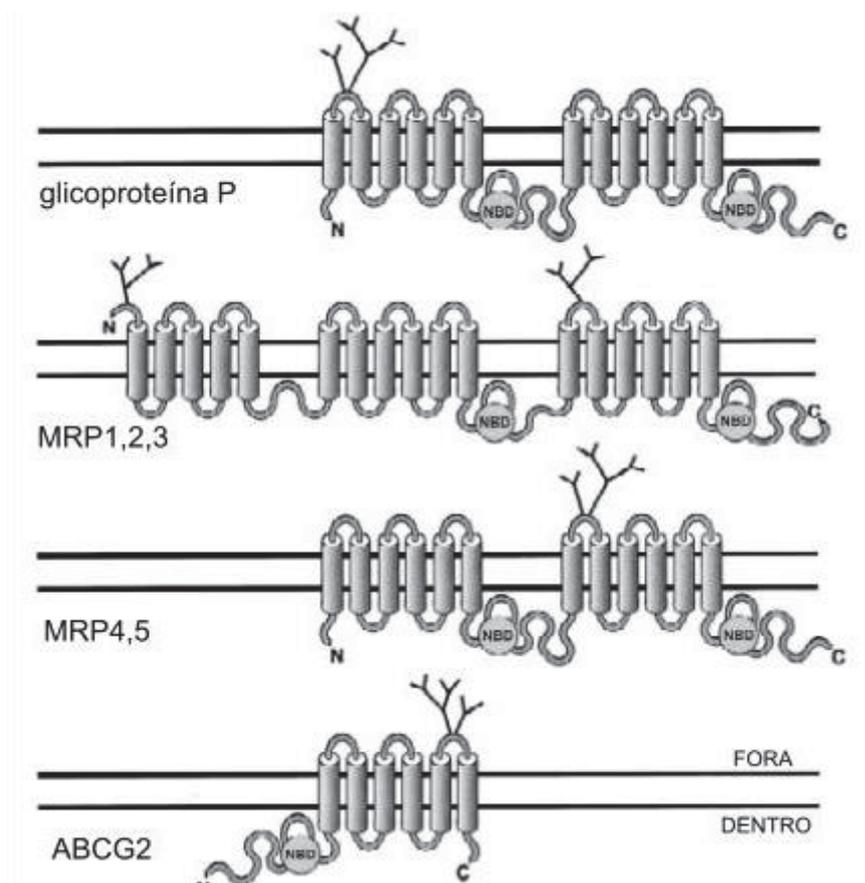
FIGURA 5 - ESTRUTURA DO TRANSPORTADOR MRP1



Fonte: Adaptado de JOHNSON; CHEN 2017.

Como observado na figura 6, MRP4 e MRP5 possuem uma estrutura com duas metades análogas onde cada uma abarca 6 segmentos transmembrana e um sítio de ligação ATP intracelular. Já MRP1, MRP2 e MRP3 possuem a estrutura semelhante à MRP4 e MRP5, porém dispõem de uma extensão *N*-terminal de 5 segmentos transmembrana (SCHINKEL 2003).

FIGURA 6 - TOPOLOGIA DOS TRANSPORTADORES ABCC (MRPs)



Fonte: Adaptado de SCHINKEL, 2003.

Na tabela 2 podemos observar as proteínas MRPs e seus respectivos genes e/ou nomes alternativos, além do número de aminoácidos, localização celular e ainda comparar com P-gp e ABCG2.

TABELA 2 - PROPRIEDADES DOS TRANSPORTADORES ABC

Proteína	Gene	Outro nome	Tamanho	Localização
MDR1 P-gp	ABCB1	PGY1, GP170	1280	Apical
MRP1 1	ABCC1	MRP	1531	Basolateral
MRP2	ABCC2	cMOAT, cMRP	1545	Apical
MRP3	ABCC3	MOAT-D, cMOAT-2	1527	Basolateral
MRP4	ABCC4	MOAT-B	1325	Apical
MRP5	ABCC5	MOAT-C, pABC11	1437	Basolateral
BCRP	ABCG2	MXR, ABCP	655	Apical

Fonte: Adaptado de SCHINKEL, 2003.

Dentre os quimioterápicos transportados por MRP1 podemos destacar as antraciclina, vinca alcalóides, etoposídeos, mitoxantrona e metotrexato (tabela 3) (HEIJIN 1997; SCHINKEL 2003).

TABELA 3 - DROGAS ANTINEOPLÁSICAS CITOTÓXICAS QUE SÃO SUBSTRATOS DO TRANSPORTADOR MRP1

Alguns substratos citotóxicos de MRP1	
Epipodofilotoxinas	Etoposídeo Teniposídeo
Vinca alcalóides	Vincristina Vinblastina
Antraciclina	Doxorubicina Daunorubicina Epirubicina Idaurubicina
Camptotecinas	Topotecan Irinotecan / SN-28
Antracenediona	Mitoxantrona
Oxiânions de metais pesados	Arsenito Antimônio trivalente

FONTE: Adaptado de SCHINKEL 2003.

2.7 INIBIDORES DE MRP1

Diferentemente da P-gp, temos poucos inibidores disponíveis para MRP1, provavelmente devido ao fato que este transportador apresenta uma predileção à compostos aniônicos. Dentre os inibidores de MRP1 podemos destacar: verapamil, MK571, sulfopirazona, benzbromarona, probenecid (SCHINKEL 2003).

MK571 (5-(3-(2-(7-chloroquinolin-2-yl) ethenyl) phenyl)-8-dimethylcarbamy-4,6-dithiaoctanoic acid), um receptor antagonista de leucotrieno LTD₄, é um inibidor competitivo com o sítio de ligação interno de MRP1. Ele pode diminuir tanto o fluxo de GSH, bem como o efluxo de drogas (KOLEY 2012). Pode inibir especificamente o efluxo de arsênio, assim aumentando seu acúmulo intracelular (VERNHET 2001).

Probenecid é um inibidor que atua em diversos transportadores ABC e apresenta um efeito inibitório comparado com MK-571, no entanto MK-571 pode

interferir potencialmente com a sinalização lipídica geral nos eritrócitos (CHRISTENSEN 2017).

Verapamil é um agente bloqueador de Ca^{2+} que possui capacidade de inibir MRP1 (TROMPIER 2004). PERROTON et al 2007 testou dois enantiômeros de verapamil (30 μM) como indutores de sensibilidade colateral em MRP1. Os resultados demonstraram que o (S)-Verapamil foi capaz de induzir morte das células tumorais resistentes e (R)-Verapamil sensibilizou as células que superexpressavam MRP1.

Alguns inibidores da P-gp, como ciclosporina A e PSC 833, também inibem MRP1, mas apenas com baixa afinidade e (obviamente) pobre especificidade. Para a inibição *in vivo* específica de MRP1, os inibidores sulfinpyrazone, benzbromarona e probenecid também não são muito adequados, pois também afetam extensivamente os sistemas de absorção de ânions orgânicos (SCHINKEL 2003). As conclusões dos autores foram que para inibir a atividade do transportador MRP1 *in vivo* será necessário o desenvolvimento de melhores inibidores, com melhores propriedades de penetração celular, boa especificidade e baixa toxicidade, pois os compostos já existentes necessitam de altas concentrações (SCHINKEL 2003).

Referente aos agentes antimicrobianos como eritromicina e difloxacina, parecem reverter a resistência a MDR mediada por Pg-P e por MRP1 *in vitro* (TERASHI 2000). Sendo assim, interações entre agentes antimicrobianos e MRP1 são de grande interesse, pois a ela provavelmente está envolvida na excreção biliar e renal de drogas e na proteção da barreira fisiológica sangue-líquido cefalorraquidiano (TERASHI 2000).

STI-571 e AG1393, dois inibidores da tirosina quinase, foram descritos para interagir com Pg-P e MRP1, inibindo suas atividades de transporte. Na sequência, gefitinibe, erlotinibe e lapatinibe que são outros inibidores da tirosina quinase, também foram encontrados para superar a MDR mediada pelos transportadores ABC. Isso sugere que TKIs podem ser promissores inibidores de MDR (ZHENG 2009).

Na tabela 4 estão representados alguns inibidores do transportador MRP1 e de outros MRPs. Também estão indicados os valores de IC_{50} de cada composto citado sob os transportadores.

TABELA 4 - INIBIDORES DO TRANSPORTADOR MRP1

Classe	Composto	Valores de IC₅₀ ou *única concentração usada (µM)
Ácido carboxílico e derivados	Glutathiona dissulfido (GSSG)	100* [Heijn 1997]
	Timcodar	4.3 [Tebrake 2016]
Agente uricosúrico	Benzbromarona	4 [Hagerstrand 2003]
	Probenecid	250* [Ebert 2014]
Análogo da piridina	PAK-104P	10 [Sumizawa 1997]
	Ilb	2,5* [Zhou 2005]
	Ilm	2,5* [Zhou 2005]
Antidiabético	Glibenclamida	26.9 [Payen 2001]
	Canaglifozin	21.5 [Mamidi 2016]
Antifúngico	Caspofungin	112 [Lempers 2016]
	Micafungin	21 [Lempers 2016]
Anti-HIV	Abacavir	10* [Weiss 2006]
	Atazanavir	42.2 [Lucia 2005]
	Delavirdina	16.7* [Weiss 2006]
	Efavirenz	10* [Weiss 2006]
	Emtricitabina	10* [Weiss 2006]
	Lamivudina	10* [Weiss 2006]
	Lopinavir	21.6 [Bierman 2010]
	Ritonavir	147* [Olson 2002]
Tenofovir	10* [Weiss 2006]	
Antiinflamatório	Celecoxibe	50* [Reid 2003]
	Diclofenaco	100* [Reid 2003]
	Flurbiprofeno	50* [Reid 2003]
	Ibuprofeno	200* [Reid 2003]
	Indometacina	50* [Reid 2003]
	Indoprofeno	50* [Reid 2003]
	Ketoprofeno	50* [Reid 2003]
Rofecoxibe	100* [Reid 2003]	
Antiparasitário	Ivermectina	3.8 [Lespine 2006]

Antiprogestatina	RU486 (Mifepristona)	18 [Payen 1999]
Benzeno e derivados	Sulfinpirazona	500* [Heijn 1997]
Benzenossulfonamida	Glyburide	150 [Gedeon 2006]
Benzotiazina	Azina tiorida	≥200 [Tebrake 2016]
Bloqueador canal de cálcio	Nicardipine	10,9 [Ivnitski-Steele 2008]
	Perexilina	1* [Cole 1989]
	Prenilamina	1* [Cole 1989]
	Verapamil	4 – 8 [Hollo 1996; Ivnitski-Steele 2008]
Cannabinoide	CBD	30.9 [Holland 2008]
	CBN	38.3 [Holland 2008]
	THC	107 [Holland 2008]
Derivados dihidropiridinas	IA ₁	20 [Sirisha 2011]
	IIA ₅	14 [Sirisha 2011]
	Ij	2,5* [Zhou 2005]
	Im	2,5* [Zhou 2005]
Derivados aniônicos da quinolina	MK571 receptor antagonista (leucotrieno LTD ₄)	1* [Leier 1994]
Derivados indoles	Indometacina	10 [Hagerstrand 2003]
Diazanaftaleno	Clofazimina	6.8 [Tebrake 2016]
Diquetopirazina	Ko143 (análogo FTC)	10 [Weider 2015]
Estilbeno	Piceatannol	42 [Wesolowska 2007]
Flavonóides	Aromadendrina	190 [Wesolowska 2007]
	Myricetin	20.2 [vanZanden 2005]
	Naringenina	122 [Wesolowska 2007]
	Quercetina	20* [vanZanden 2007]
Glicocorticóide	Mifepristona	18 [Payen 1999]
Imunossupressor	Ciclosporina A	2 – 4 [Hollo 1996]
	Deforolimus	4,9 [Peterson 2017]
	Everolimus	2,6 [Peterson 2017]
	Sirolimus	2,8 [Peterson 2017]
	Temsirolimus	5,6 [Peterson 2017]
	VX-710 (Bircodar)	2.5* [Minderman 2004]
	Gefitinibe	10 [Oozvegy-Laczka 2004]

	Vandetanibe	4.2 [Zheng 2009]
Inibidor via Hedgehog	HhAntag691 Vismodegibe	~5.0 [Zhang 2009]
Lactamas	Amoxicilina	≥200 [Tebrake 2016]
Lipídeos de prenil	SQ109	85 [Tebrake 2016]
Macrolactamas	Rifampicina	32 [Tebrake 2016]
Quinolina	CBT-1	10* [Robey 2008]
	Ofloxacina	21.7 [Terashi 2000]

Fonte: O Autor (2021). Valores de IC₅₀ representados acima e *valores de uma única concentração usada. Ao lado de cada valor possui seu respectivo estudo de referência.

2.8 HÍBRIDOS MOLECULARES

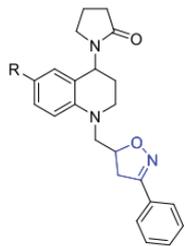
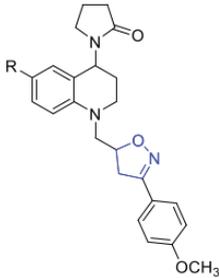
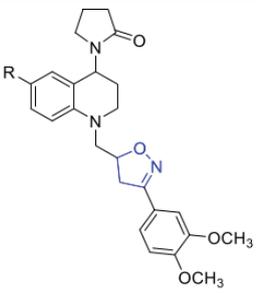
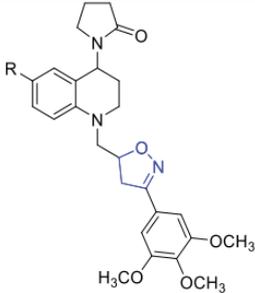
Na corrida contra a MDR, encontrar novos inibidores tem sido uma estratégia amplamente utilizada. Assim surgiram os compostos híbridos, uma nova estratégia sintética e promissora, na qual é baseada em compostos que podem modular muitos alvos, aumentando assim a efetividade quando comparada com uma droga com um único alvo (BERNAL 2020).

A hibridização molecular é um novo conceito de design de drogas e visa desenvolver novos compostos que aumentem a eficácia e afinidade, quando comparados com drogas usuais. Consiste em uma estratégia baseada em reconhecimento de sub-unidades farmacóforas (região da molécula de um ligante que está intimamente ligado ao seu receptor) na estrutura molecular de dois ou mais derivados bioativos, para que essas sub-unidades possam se juntar e originar um novo design de composto, porém mantendo as características pré-selecionadas do original. Esses compostos podem apresentar sinergia no efeito farmacológico ou reduzir a probabilidade de resistência a novas drogas (NEPALI 2014).

Já foi visto que compostos híbridos com diferentes estruturas como chalconas, cumarinas, quinolinas e indoles possuem fortes potenciais em atividades biológicas, incluindo a atividade anticâncer (BERNAL 2020). A quinina é um produto natural e desde a sua descoberta, foi utilizada como primeira droga contra a malária. Análogos de quinolina reduzidos a tetrahydroquinolinas são de grande interesse na área da química medicinal, pois muitos desses compostos heterocíclicos exibem um vasto alcance em atividades biológicas como citado anteriormente (BERNAL 2020).

Recentemente, Vesga e colaboradores (2021) testaram os híbridos da classe das tetrahydroquinolinas/4,5-dihidroisoxazoles frente ao transportador ABCG2. Na tabela 5 está representado a estrutura base dos compostos, divididos em quatro grupos (A – D) que diferem em seus radicais. Dentro da divisão dos quatro grupos tem-se uma subdivisão onde se diferem os substituintes do radical. Pode-se observar dois principais grupos químicos nesses compostos, o anel de tetrahydroquinolina e o anel isoxazol. Todas as substituições estão no radical R do anel de tetrahydroquinolina.

TABELA 5 – ESTRUTURA DOS COMPOSTOS E SEUS DIFERENTES SUBSTITUÍNTES

Estrutura	Composto	R	Estrutura	Composto	R
	A1	H		B1	H
	A2	CH ₃		B2	CH ₃
	A3	OCH ₃		B3	OCH ₃
	A4	Cl		B4	Cl
	C1	H		D1	H
	C2	CH ₃		D2	CH ₃
	C3	OCH ₃		D3	OCH ₃
	C4	Cl		D4	Cl

Fonte: Adaptado de VESGA 2021.

Dentre os 16 compostos, 5 foram classificados como os mais promissores frente ao transportador ABCG2, uma vez que produziram mais de 50% da inibição (VESGA 2021). Apesar da caracterização do mecanismo de inibição do transportador ABCG2, essa classe de compostos não foi explorada frente aos transportadores P-gp e MRP1.

3 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar compostos moleculares híbridos da classe das tetrahydroquinolinas/4,5-dihidroisoxazoles como novos inibidores do transportador MRP1.

3.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar um screening com 16 compostos derivados de tetrahydroquinolinas/4,5-dihidroisoxazoles como inibidores do transportador MRP1;
- Avaliar o IC₅₀ de inibição dos melhores compostos;
- Avaliar o transporte mediado por MRP1;
- Identificar a razão terapêutica;
- Identificar o tipo de inibição;
- Realizar um estudo de *docking* para identificar o sítio de ligação dos inibidores no transportador MRP1;
- Avaliar a capacidade dos inibidores em reverter a resistência ao tratamento quimioterápico em estudos de viabilidade celular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COMPOSTOS UTILIZADOS

Os compostos utilizados foram sintetizados pelo grupo de pesquisa parceiro da Universidade Santander na Colômbia (Prof. Dra. Stelia Carolina Mendez-Sánchez).

4.2 SOLUÇÕES

Os compostos foram dissolvidos em DMSO (Merck) para que fossem obtidas soluções estoque de 10 e 50 mM. As soluções em DMSO foram estocadas à -20°C e descongeladas no momento do uso.

4.3 LINHAGENS CELULARES

Utilizou-se células (BHK21) transfectadas de maneira estável para superexpressar o transportador MRP1 (BHK21-MRP1) e a linhagem não transfectada (wild type) como controle.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DO TRANSPORTADOR MRP1

Foi utilizada uma placa com 24 poços para plaquear as células BHK21-MRP1 ($1,5 \times 10^5$ por poço). Após 24h de adesão, as células foram tratadas com Calceína-AM (0,15 μ M). O período de tratamento teve duração de 30 minutos a 37°C na presença ou ausência de duas concentrações (10 e 50 μ M) dos compostos testados (ou com o inibidor de referência, verapamil). Posterior à incubação, foi utilizado solução salina (PBS) a 37 °C para lavar as células e logo em seguida utilizada tripsina para soltar as células aderidas. As células foram ressuspensas em 300 μ L de PBS gelado e mantidas em gelo até serem analisadas em citômetro de fluxo. Foi utilizado o filtro 530 nm para leitura da fluorescência emitida pela calceína. Para esse estudo foram coletados 10000 eventos de cada amostra. Para obter o controle de 100% de inibição foi utilizada a mediana das fluorescências das células controle (wild type), ou células BHK21-MRP1 incubadas com o inibidor de referência

(Verapamil 30 μM). Foi utilizado o Citômetro BD FACS Celesta para leitura das amostras. Os percentuais foram calculados em relação ao controle positivo de inibição e foram determinados matematicamente através da seguinte equação:

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

Onde:

I_{inibidor} = fluorescência da amostra exposta ao substrato fluorescente e tratado com derivado de tetrahydroquinolinas/4,5-dihidroisoxazoles;

$I_{\text{referência}}$ = fluorescência da amostra exposta ao substrato fluorescente e tratado com o inibidor de referência em questão;

S = fluorescência da amostra exposta ao substrato fluorescente na ausência de inibidores.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS VALORES DE IC_{50} DE INIBIÇÃO

Para avaliação dos valores de IC_{50} de inibição foi utilizado o método de ensaio de transporte em tubos padronizado pelo laboratório. Após contagem de uma garrafa média com confluência de 90% em câmara de Neubauer, foi coletado 1×10^5 a 3×10^5 células/tubo e centrifugado a 2000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionado 200 μL de meio + substrato (calceína 0,15 μM) + tratamento com inibidor (0,1 - 50 μM). Feito isso, foi incubado a 37°C por 45 minutos. Após a incubação, foi feita mais uma centrifugação a 2000 RPM por 5 minutos e retirado o sobrenadante e as células foram ressuspensas com PBS gelado e mantidas em gelo até ser analisado em citômetro de fluxo. A porcentagem de inibição foi determinada utilizando o verapamil (30 μM) como referencial de 100% inibição. Os valores de IC_{50} foram calculados utilizando o programa GraphPad Prism.

4.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO E EFEITO SOBRE REVERSÃO DA RESISTÊNCIA MEDIADA PELO TRANSPORTADOR MRP1 ATRAVÉS DE ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o método MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]). Células BHK21-MRP1 e BHK21 wild type foram plaqueadas em placas de 96 poços (3×10^4 e 1×10^4 células/poço, respectivamente). Após 24h de adesão as células foram tratadas com concentrações crescentes dos compostos (0,39 - 100 μM) e incubadas por 24 e 72h para obtenção dos dados de citotoxicidade dos compostos. Para os ensaios de reversão da resistência em células que superexpressam MRP1, o ensaio de viabilidade celular foi realizado na presença de dois quimioterápicos (daunorubicina e etoposídeo a 50 μM) em co-tratamento com o composto A1 e D1 (10 μM), por 24h de tratamento. Após o período de tratamento foi adicionado 20 μL de solução de MTT em PBS (0,5 mg/ml – concentração final) e seguido por um período de incubação de 4h, possibilitando o processo de metabolização do MTT. Após a incubação foi retirado todo o meio de cultivo e adicionado 100 μL de solução de DMSO e etanol (1:1) para dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi determinada utilizando um leitor de microplaca da BioRad em um comprimento de onda de 595nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (sem tratamento).

4.7 ENSAIO DE LAVAGEM

Células BHK21-MRP1 foram plaqueadas em placas de 24 poços (2×10^5 células/poço). Após 24h de adesão, alguns poços selecionados foram tratados com os compostos A1 e D1 na concentração final de 10 μM e incubadas a 37°C por 45 minutos e os outros poços se mantiveram sem manipulação. Após esse período, o meio com inibidor foi removido, as células foram lavadas com PBS e incubadas apenas com meio de cultura a 37°C por 5h. Após esse período, alguns poços selecionados, diferentes dos supracitados, foram tratados com os compostos A1 e D1 na concentração final de 10 μM . Todos os poços da placa (exceto o branco) foram então tratados com o substrato calceína (0,15 μM). A placa foi incubada a 37°C por 45 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS à 37°C,

adicionado uma gota de tripsina no poço e ressuspendido em 300 μ L de PBS gelado. As células foram mantidas em gelo até a análise em citômetro de fluxo.

4.8 DOCKING MOLECULAR

A obtenção da estrutura cristalográfica se deu por meio do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), no qual foi inserido o nome da proteína de interesse (ABCC1), como palavra-chave na busca. Dada a ausência de uma estrutura completa da versão humana de MRP1 e a grande similaridade com a MRP1 bovina (91%), optou-se por utilizar essa última, ligada ao Leucotrieno C4. Após o *download* do arquivo pdb, seguiu-se para um pré-processamento utilizando a versão acadêmica do *software* Maestro 12.4, no qual foi feita a remoção do ligante co-cristalizado e a adição de átomos de hidrogênio, sendo otimizados para o pH fisiológico de 7,4.

Posteriormente, as estruturas tiveram apenas os hidrogênios polares mantidos e foram convertidas para o formato pdbqt utilizando o programa AutoDockTools 1.5.6. O desenho inicial dos substratos e inibidores escolhidos se deu no programa BIOVIA Draw 2019, prosseguindo então para uma geração da sua estrutura tridimensional no *software* Avogadro, com uma pré-otimização de geometria utilizando a ferramenta de Auto Otimização no campo de força MM94s, seguida de inspeção visual para garantir que não houvesse erros. Utilizando também o Avogadro, preparou-se o arquivo das moléculas para uma segunda otimização de geometria no MOPAC2016, com o método PM7. Finalizando essa etapa, converteu-se os arquivos para o formato pdbqt, também no AutoDockTools, garantindo que todas as ligações rotacionáveis permanecessem liberadas. Para o *docking*, foi usado o AutoDock Vina 1.1.2, no qual se delimitou uma *gridbox*, pautando-se pela região central em que o LTC4 foi identificado originalmente.

As coordenadas atômicas do centroide da *gridbox* foram definidas como: X = 84.602; Y = 57.943; Z = 59.056, com dimensões de 40 Å nos três eixos. O parâmetro de *exhaustiveness* foi definido em 75, o número máximo de resultados (poses) em nove com variação máxima de 2 kcal/mol da primeira para última conformação. Após realizado o processo com todas as moléculas (substratos e inibidores), os

resultados foram analisados e figuras foram geradas com auxílio dos programas PyMOL *open-source* v2.5.0 e Maestro, sendo o último usado para determinar as interações intermoleculares entre as moléculas e a cadeia lateral da proteína.

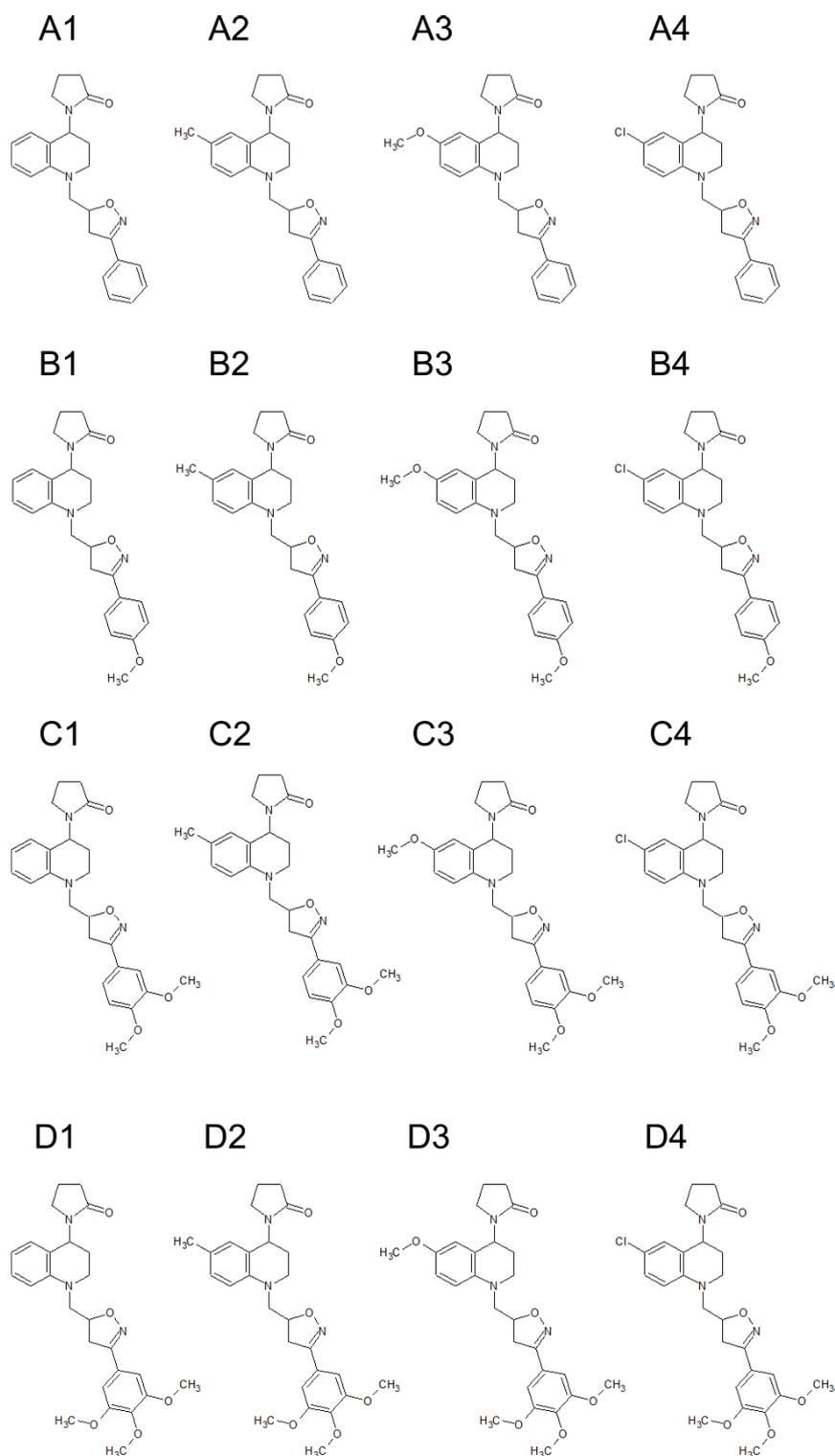
O alinhamento das sequências genéticas de ABCC1 humano e bovino foram realizadas por meio da ferramenta *web* *EMBOSS Needle* (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Ao término do alinhamento, esse programa exibe também os percentuais de identidade e similaridade entre as duas sequências.

5 RESULTADOS

5.1 DERIVADOS DE TETRAHIDROQUINOLINAS/4,5DIHIDROISOXAZOLES AVALIADOS NESTE ESTUDO

Os híbridos moleculares pertencentes à classe das tetrahydroquinolinas/4,5-dihidroisoxazoles utilizados neste estudo foram sintetizados pelo grupo da professora Dra. Stelia Carolina Mendez da Universidade Santander (Colômbia). As estruturas químicas avaliadas estão apresentadas na figura 7. Esse conjunto de 16 tetrahydroquinolinas/4,5-dihidroisoxazoles correspondem aos mesmos compostos que foram testados recentemente como inibidores do transportador ABCG2 (VESGA et al. 2021).

FIGURA 7 - ESTRUTURAS DOS
TETRAHIDROQUINOLINAS/4,5DIHIDROISOXAZOLES



Fonte: O Autor (2021)

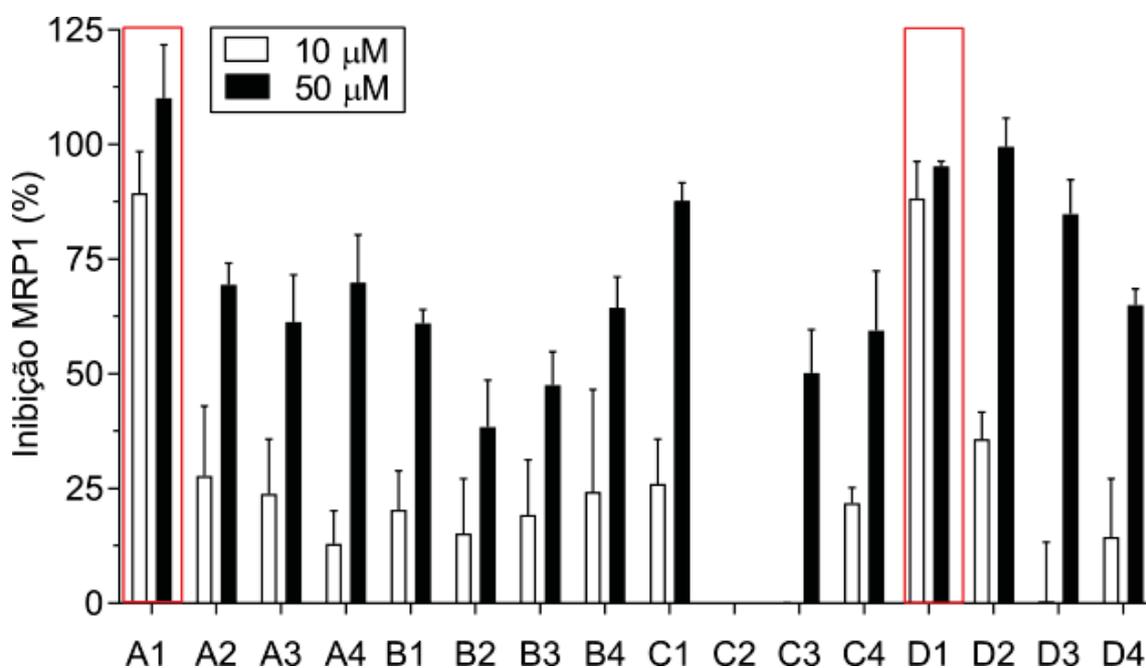
NOTA: Os derivados de tetrahydroquinolinas/4,5dihidroisoxazoles, também denominados de A, B, C e D seguidos de numeração de 1 a 4, diferenciam-se entre si por grupamentos substituintes.

5.2 AVALIAÇÃO DOS DERIVADOS DE TETRAHIDROQUINOLINAS/4,5DIHIDROISOXAZOLES COMO INIBIDORES DO TRANSPORTADOR MRP1

Para avaliar a capacidade de inibição do transportador MRP1, as células BHK21-MRP1 foram submetidas ao tratamento com os 16 compostos nas concentrações de 10 e 50 μM . O substrato de MRP1 utilizado foi a calceína-AM (0,15 μM) e o inibidor de referência foi o verapamil (30 μM). O efeito inibitório dos compostos foi avaliado por citometria de fluxo.

Como apresentado na figura 8, observou-se que 15 dos 16 híbridos moleculares de tetrahydroquinolinas/4,5-dihidroisoxazoles inibiram o transporte de calceína mediado pelo transportador MRP1. Apenas o composto C2 não produziu nenhum efeito. Ainda, dois compostos (A1 e D1) foram capazes de produzir um efeito máximo de inibição do transportador MRP1 na menor concentração testada, de 10 μM .

FIGURA 8 - INIBIÇÃO DO TRANSPORTADOR MRP1



Fonte: O Autor (2021)

Figura 8. NOTA: Células BHK21-MRP1 foram expostas concomitantemente à calceína-AM (0,15 μM) e os 16 compostos (10 e 50 μM). O percentual de inibição foi determinado utilizando o verapamil (30 μM) como inibidor de referência (100% de inibição). A quantificação intracelular de calceína-AM foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como percentuais de inibição em

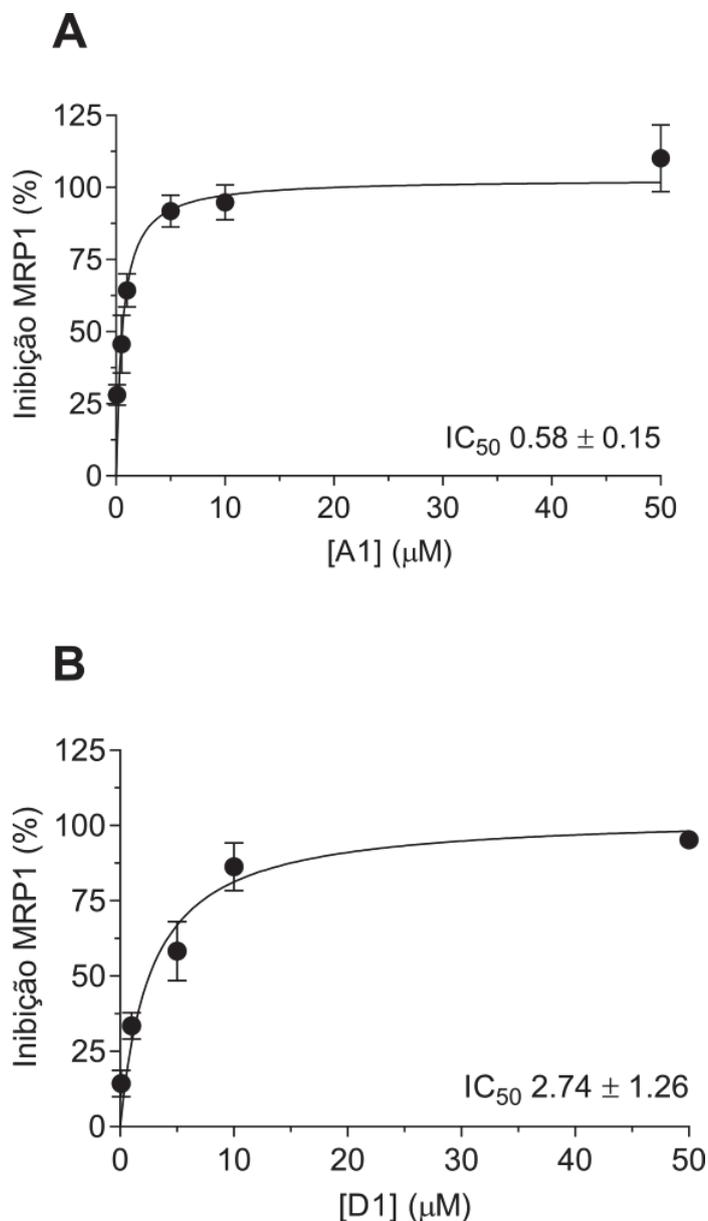
relação ao controle com verapamil e representam a média \pm DP de pelo menos três experimentos independentes. Os compostos A1 e D1, destacados em vermelho, foram selecionados como os melhores.

5.3 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE IC₅₀ DE INIBIÇÃO PARA OS COMPOSTOS A1 E D1

Haja vista que os híbridos moleculares de tetrahydroquinolinas/4,5-dihidroisoxazoles A1 e D1 foram os mais promissores na triagem inicial, ambos foram testados em diferentes concentrações para determinação dos valores de IC₅₀ de inibição (concentração que reduz metade da inibição máxima), possibilitando assim determinar a afinidade dos compostos pelo transportador MRP1.

Comparando os valores IC₅₀ de inibição produzidos pelos compostos A1 e D1, evidenciou-se que o composto A1 apresentou um valor de 0.58 μ M, aproximadamente cinco vezes inferior ao valor observado para o composto D1 (2.74 μ M). Esses resultados demonstram que o composto A1 é o mais potente inibidor de MRP1 da série testada (Figura 9). O valor inferior a 1 μ M o torna um candidato promissor para futuros testes em modelo animal, ou ainda servir como núcleo básico para modificações químicas.

FIGURA 9 – CURVAS DE INIBIÇÃO DE MRP1 PARA DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE IC_{50}



Fonte: O Autor (2021)

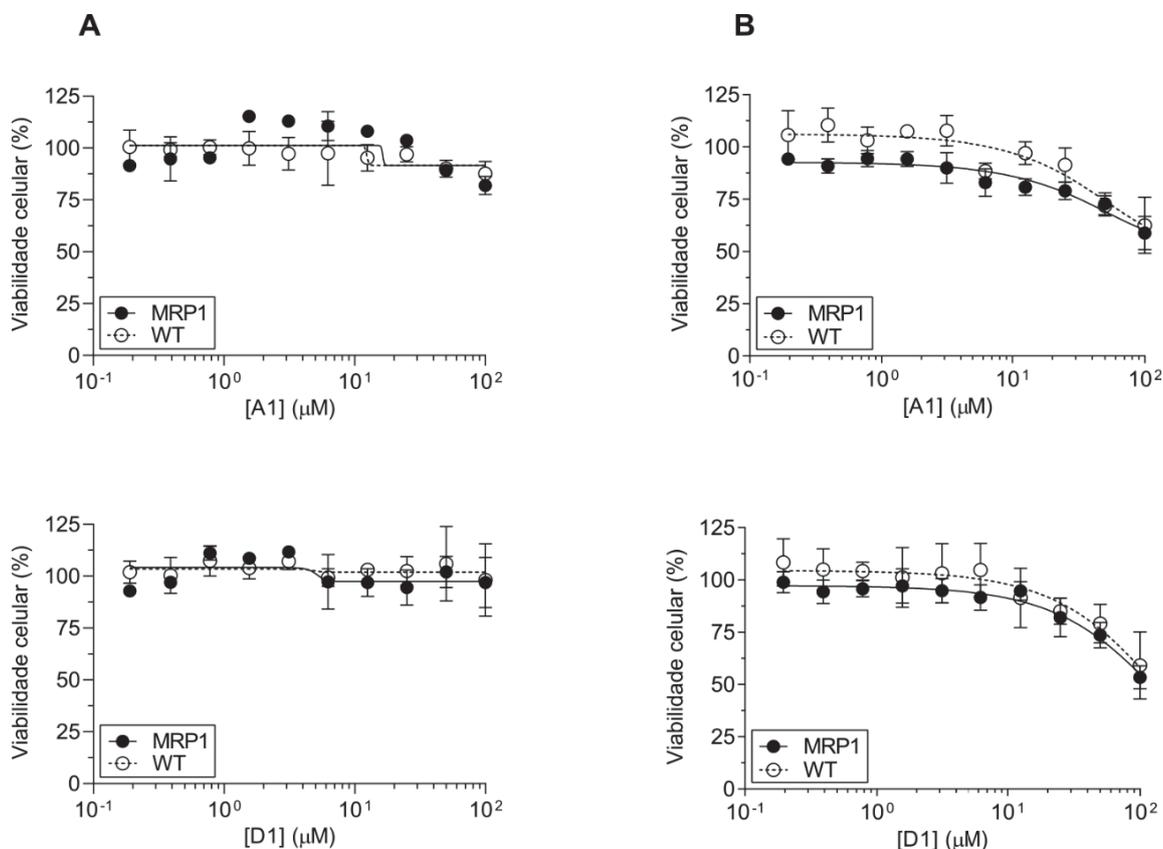
NOTA: (A) A1 (B) D1. Células BHK21-MRP1 foram expostas à calceína-AM (0,15 μM) e concentrações crescentes dos compostos A1 e D1 (0,1 – 50 μM). A porcentagem de inibição foi determinada utilizando o verapamil (30 μM) como referencial de 100% de inibição. Os valores foram obtidos a partir da determinação do acúmulo intracelular de calceína-AM por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como percentuais de inibição e representam a média \pm SEM de pelo menos três experimentos independentes. As curvas para determinar os valores de IC_{50} de inibição do transporte de calceína-AM mediado pelo transportador MRP1 foram construídas utilizando o programa GraphPad Prism 8.

5.4 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS A1 E D1

Para avaliar o efeito citotóxico dos inibidores mais promissores, A1 e D1, foi empregado o ensaio de viabilidade celular popularmente conhecido como MTT. Foram utilizadas células BHK21-MRP1 e BHK21 *wild type* (linhagem selvagem). Ambas as linhagens celulares foram expostas por 24h aos compostos A1 e D1 em uma faixa de concentração variando de 0,39 a 100 μM .

Como podemos observar na figura 10A, ambos inibidores não foram citotóxicos mesmo na maior concentração testada (100 μM). A ausência de citotoxicidade é um dos parâmetros desejados para novos inibidores de transportadores ABC. Contudo, torna-se importante ressaltar que esse ensaio, para compostos citotóxicos, também serve para avaliar um possível transporte mediado pelo transportador superexpresso, nesse caso MRP1. No caso de compostos transportados, normalmente é observado um menor efeito citotóxico na linhagem celular que superexpressa o transportador. Na tentativa de explorar essa característica do ensaio, o mesmo procedimento foi realizado após 72h de tratamento com os compostos A1 e D1.

FIGURA 10 – CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS A1 E D1



Fonte: O Autor (2021)

NOTA: Células BHK21-MRP1 e BHK21 *wild type* foram expostas a concentrações crescentes dos compostos A1 e D1 (0,39 – 100 μM) por 24h (A) e 72h (B). Os resultados foram obtidos aplicando o método MTT e expressos como percentual de células viáveis em relação ao controle não tratado. Os valores representam a média \pm DP de pelo menos três experimentos independentes.

Após 72 de exposição foi possível observar um leve efeito citotóxico a partir da concentração de 25 μM (Figura 10B). Contudo, mesmo em 100 μM , não foi possível determinar com precisão os valores de IG_{50} (concentração necessária para obter 50% de redução na quantidade de células viáveis) (Figura 10B). Ainda, os compostos A1 e D1 apresentaram um perfil citotóxico similar em ambas as linhagens celulares, BHK21-MRP1 e BHK21 *wild-type*, sugerindo ausência de transporte mediado por MRP1, outra característica desejada para novos inibidores.

Com os valores de IC_{50} de inibição e uma estimativa de valores de IG_{50} de citotoxicidade, nesse caso, valores superiores a 100 μM , foi possível estimar a razão terapêutica (RT), como representado na tabela 5. Uma razão terapêutica superior a 170 foi observada para o composto A1. Normalmente inibidores de transportadores

ABC que apresentam uma RT superior a 100 são considerados bons candidatos para seguirem em testes pré-clínicos em modelo animal. Assim, esses resultados confirmam que o inibidor A1 é o melhor da série testada.

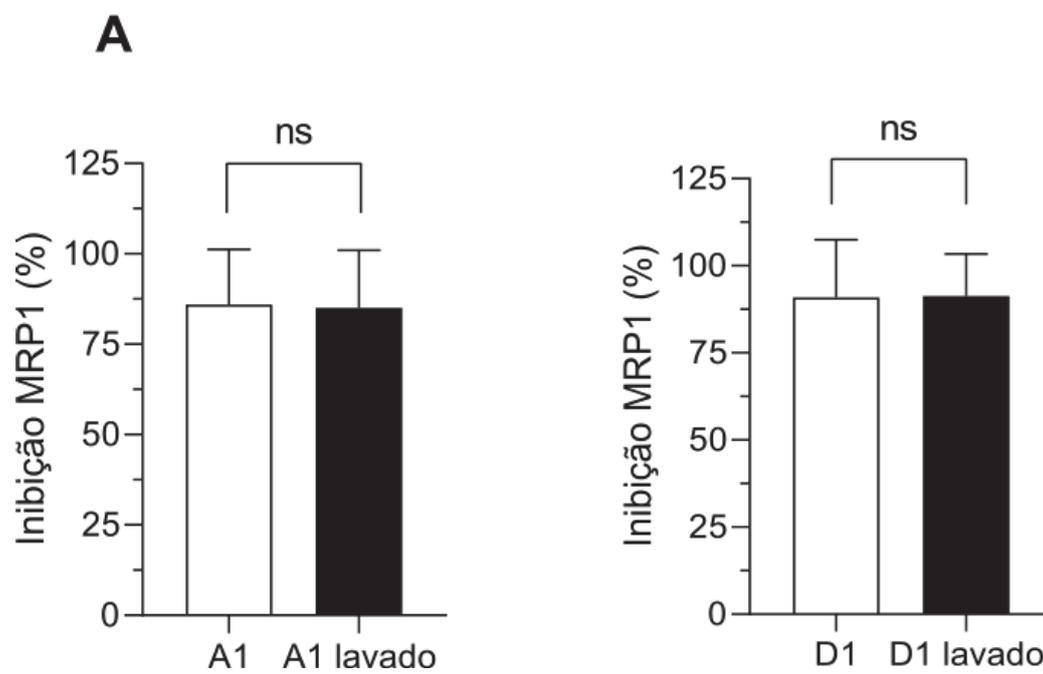
TABELA 6 - VALORES DE IC₅₀, IG₅₀ E RAZÃO TERAPÊUTICA DOS COMPOSTOS A1 E D1

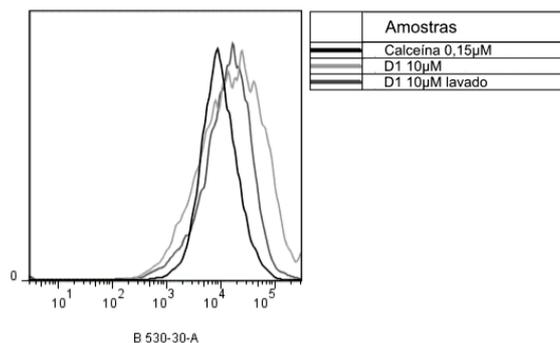
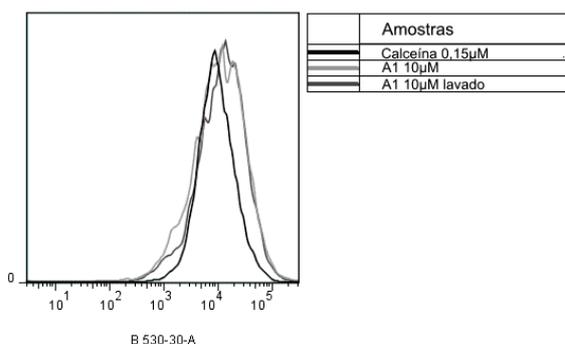
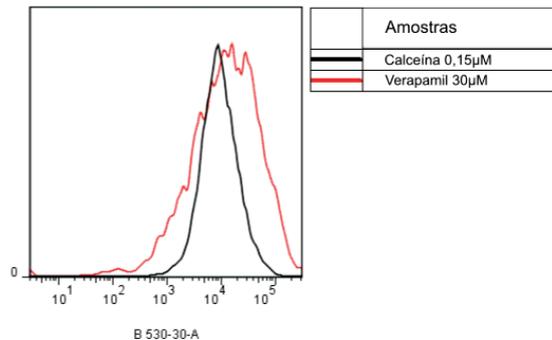
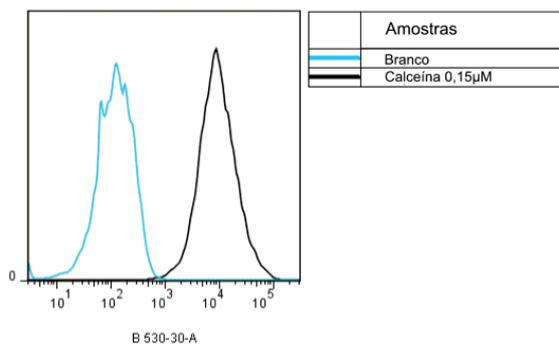
Compostos	IC₅₀ ± DP Inibição (µM)	IG₅₀ Citotoxicidade (µM)	Razão Terapêutica (IG₅₀/IC₅₀)
A1	0,58±0,15	>100	>170
D1	2,74±1,26	>100	>35

5.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO APÓS REMOÇÃO DO INIBIDOR

Para confirmar a ausência de transporte, um ensaio de remoção do inibidor do meio de cultivo foi realizado. Compostos que são transportados, mas atuam como inibidores, após remoção do meio de cultivo geralmente apresentam redução nos valores de inibição. Na figura 11A observamos que a remoção dos inibidores A1 e D1 do meio de cultivo não afetou sua inibição, uma vez que não foi observada diferenças significativas comparado as condições de presença *versus* remoção do inibidor. Esse resultado confirma a ausência de transporte do inibidor pelo transportador MRP1. Na figura 11B estão apresentados os histogramas representativos obtidos por citometria de fluxo.

FIGURA 11 – ENSAIO DE REMOÇÃO DO INIBIDOR



B

Fonte: O Autor (2021)

NOTA: (A) Células BHK21-*MRP1* foram expostas a concentração saturante dos compostos A1 e D1 (10 µM). Na condição “lavado”, as células foram incubadas por 45 minutos com o inibidor. Após esse tempo o tratamento foi removido e as células lavadas com PBS, seguido de uma incubação de 5 horas com meio de cultivo livre sem inibidor. Após esse período as células foram incubadas por 45 minutos com o substrato calceína-AM. Na condição teste normal, as células foram incubadas concomitantemente com inibidor e substrato por 45 minutos. A porcentagem de inibição foi determinada usando o verapamil (30 µM) como referencial de 100% de inibição. Os valores foram obtidos a partir da determinação do acúmulo intracelular de calceína-AM por citometria de fluxo. Valores representam a média ± SD de pelo menos três experimentos independentes. (B) Histogramas obtidos por citometria de fluxo.

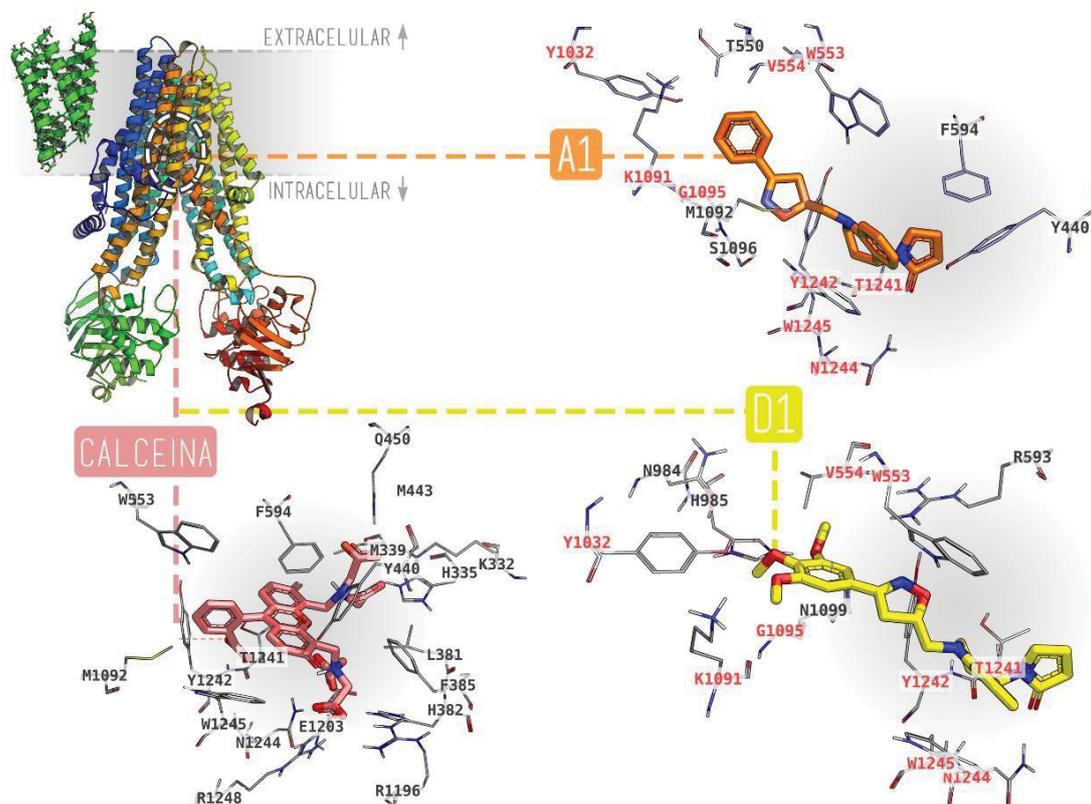
5.6 ANÁLISE DE DOCKING MOLECULAR

Para identificar o sítio de ligação da calceína e dos compostos A1 e D1, foi realizado uma análise de docking molecular. Em relação a outros transportadores de relevância na MDR, como P-gp e ABCG2, existe uma desigualdade para MRP1 em termos de estruturas tridimensionais completas disponíveis na base de dados *Protein Data Bank* (PDB). Atualmente existem apenas duas opções de estruturas da MRP1 humana, ambas relativas a porção NBD1 da macromolécula, sendo insuficiente para um estudo de *docking* molecular de substratos e inibidores, uma vez que seu sítio clássico de interação se localiza no domínio transmembrana (TMD), como observado nas outras proteínas da família.

A MRP1 humana e a MRP1 bovina tem identidade de 90,7% e similaridade de 96,1%, por isso a MRP1 bovina foi utilizada para realizar os experimentos de docking. A estrutura escolhida foi uma versão ligada ao leucotrieno C4 (LTC4), um substrato de MRP1. Foi realizado o docking molecular da calceína e dos inibidores A1 e D1. Após a realização dos experimentos de *docking*, os resultados foram analisados com auxílio do programa Maestro 2019, para identificação dos aminoácidos potencialmente envolvidos na ligação dos inibidores e substratos.

Os resultados obtidos em *docking* se mostraram consonantes com aquilo apresentado na estrutura cristalográfica em termos de sítio de ligação e interação com cadeias laterais, com os três compostos ancorados na mesma região de afinidade do LTC4. A calceína (-9,3 kcal/mol), negativamente carregada, aparenta formar pontes salinas envolvendo as porções carboxilato da molécula e os resíduos R1248 e 1196 e K332, juntamente de uma ponte de hidrogênio entre N1244. Em relação ao inibidor A1 (-9,6 kcal/mol), houve um Empilhamento Pi com W1245 e um anel aromático. O inibidor D1 (-9,7 kcal/mol), em contraste com a sua atividade inibitória menos pronunciada em relação ao A1, exibiu uma quantidade relativamente alta de interações, em especial pontes de hidrogênio com Y1242, N1244, W553 e N1099, somadas a um Empilhamento Pi com W1245 (Figura 12).

FIGURA 12 – DOCKING MOLECULAR DOS COMPOSTOS A1 E D1 NO TRANSPORTADOR MRP1



Fonte: O Autor (2021)

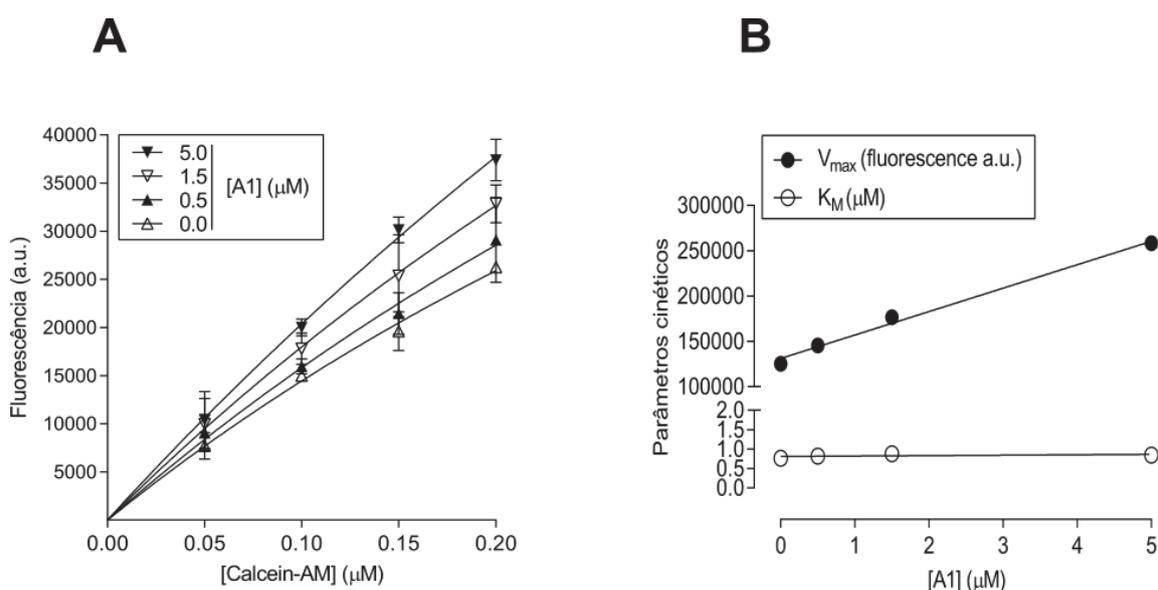
NOTA: *Docking* molecular da calceína-AM e dos compostos A1 e D1 no transportador MRP1. Nas figuras estão evidenciados dois dados importantes: os aminoácidos em proximidade das moléculas e potenciais interações molécula-aminoácido. Os aminoácidos representados em vermelho são aminoácidos em comum entre o A1 e D1.

Estruturalmente falando, MRP1 possui dois sítios distintos, o sítio P (carregado positivamente) e o sítio H (hidrofóbico). Ambos os inibidores avaliados *in silico* apresentaram uma maior afinidade pelo sítio H na maioria das poses (total de 9), com apenas a pose 4 (para o A1) e a pose 7 (para A1 e D1), mais deslocadas em direção ao sítio P. Em linhas gerais, observando as três poses de maior energia ranqueadas pelo AutoDock Vina, pode-se estimar que a ligação desses inibidores é influenciada majoritariamente pelos resíduos W1245, Y1242, F594, W553, N1099 e N1244 (Figura 12). A calceína, como esperado por conta do seu caráter aniônico, ancora-se de maneira direcionada ao sítio P.

5.7 TIPO DE INIBIÇÃO PROMOVIDO PELO A1

Uma vez que o ensaio de *docking* molecular revelou uma sobreposição dos sítios de ligação dos inibidores A1 e D1 e considerando que A1 foi o inibidor mais promissor, baseado nos valores de IC_{50} de inibição, um ensaio para avaliar o tipo de inibição foi realizado. Variando a concentração de substrato calceína-AM e inibidor A1 foram determinados os parâmetros cinéticos de K_M e V_{MAX} . Conforme observamos na figura 13, o inibidor A1 não afetou o K_M da reação, porém, promoveu um aumento de V_{MAX} . Esse perfil é característico de um inibidor não competitivo, confirmando o resultado de *docking* molecular, que sugeriu um sítio de ligação diferente entre os inibidores A1 e D1 *versus* a calceína-AM.

FIGURA 13 – TIPO DE INIBIÇÃO PROMOVIDO POR A1



Fonte: O Autor (2021)

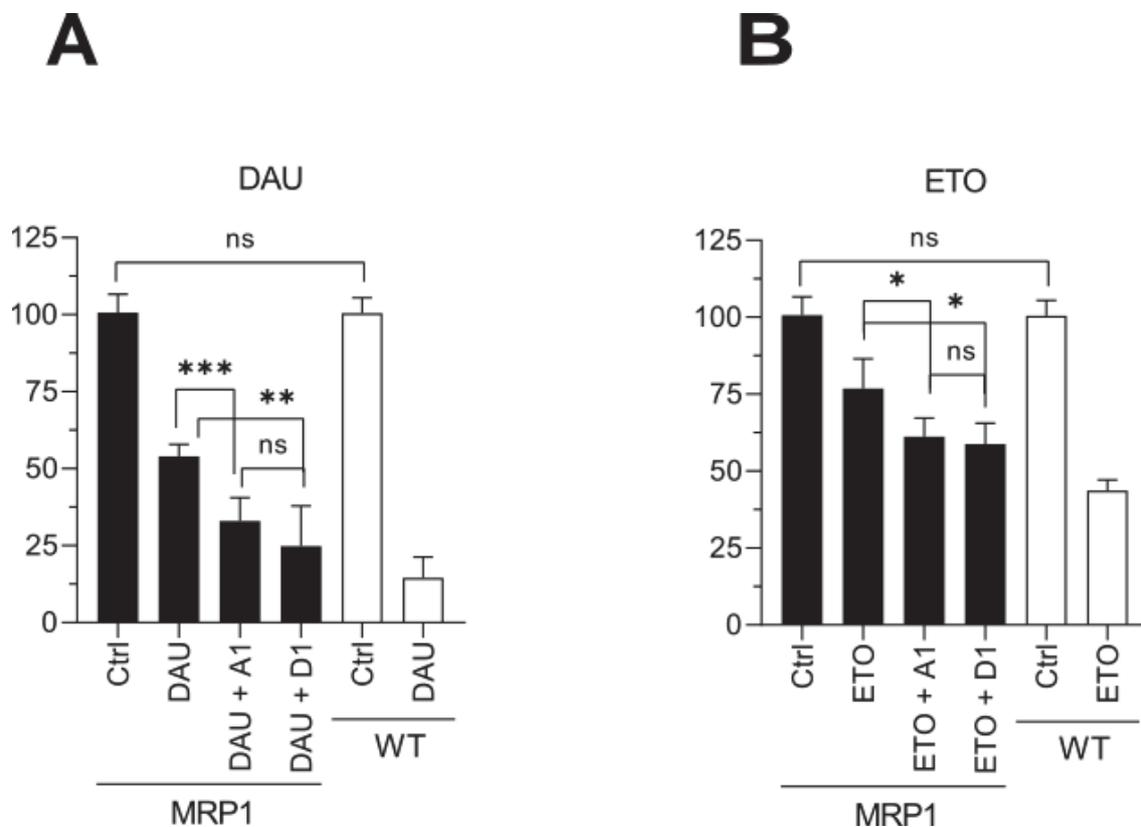
NOTA: (A) Dados brutos de fluorescência. (B) Parâmetros cinéticos. Células BHK21-MRP1 foram expostas a concentrações crescentes de calceína-AM (0,05 – 2 μM) e do composto A1 (0 – 5 μM). Os valores foram obtidos a partir da determinação do acúmulo intracelular de calceína-AM por citometria de fluxo. Os parâmetros cinéticos foram obtidos através de análises cinéticas conforme o método de Michaelis-Menten obtidos pelo GraphPad Prism 8. Valores representam a média \pm SEM de pelo menos três experimentos independentes.

5.8 REVERSÃO DA RESISTÊNCIA MEDIADA PELO TRANSPORTADOR MRP1

Para confirmar se os compostos A1 e D1 possuem as características necessárias para prosseguir em futuros estudos de modelo animal, um ensaio de reversão do fenótipo de resistência ao tratamento quimioterápico mediado por MRP1 foi realizado. No ensaio de reversão foram utilizadas células BHK21-MRP1 e células BHK21 *wild type*, as quais foram tratadas por 24h com os quimioterápicos daunorubicina e etoposídeo, ambos substratos conhecidos de MRP1. Em paralelo, as células foram submetidas a um tratamento concomitantemente com os mesmos quimioterápicos e os inibidores A1 e D1 na concentração de 10 μ M.

Na figura 14 é possível observar que os quimioterápicos utilizados promoveram um efeito citotóxico em ambas as linhagens celulares, BHK21-MRP1 e BHK21 *wild type*. Ainda, o efeito citotóxico foi menos pronunciado em células superexpressando o transportador MRP1, devido ao conhecido transporte de daunorubicina e etoposídeo pelo transportador. Podemos observar na figura 14 que ambos os inibidores A1 e D1, quando usados de maneira concomitante com os quimioterápicos, potencializaram o efeito citotóxico dos quimioterápicos em células BHK21-MRP1, confirmando que a inibição observada por citometria de fluxo usando o substrato calceína-AM se confirma em experimentos de viabilidade celular utilizando substratos quimioterápicos.

FIGURA 14 – REVERSÃO DA RESISTÊNCIA REALIZADA PELO TRANSPORTADOR MRP1



Fonte: O Autor (2021)

NOTA: Células BHK21-MRP1 e BHK21 *wild type* foram expostas à 50 μ M de daunorubicina (A) e 50 μ M de etoposídeo (B) em co-tratamento com os compostos A1 e D1 na concentração de 10 μ M por 24 horas. Os valores foram obtidos através do método de MTT. Os resultados foram expressos como percentual de células viáveis em relação ao controle e representam a média \pm DP de pelo menos três experimentos independentes.

6 DISCUSSÃO

Um dos grandes desafios da atualidade na área oncológica é a resistência mediada por transportadores ABC. Nesse contexto, a melhor estratégia parece ser o uso de inibidores destes transportadores, ou seja, compostos que possam ser usados de maneira concomitante com a quimioterapia convencional (VALDAMERI; PEREIRA RANGEL; et al. 2012). Objetivando a identificação de novos inibidores, a estratégia de *screening* é uma das mais utilizadas com sucesso (BURGER & FIEBIG 2014). Fazer o *screening* com diferentes classes de compostos pode apresentar muitas vantagens, como por exemplo, o baixo custo, pois pode ser realizado em modelos *in vitro* (GAMEIRO et al., 2017).

Partindo desta tática, neste estudo foi realizado um *screening* com 16 híbridos moleculares da classe das tetrahydroquinolinas/4,5-dihidroisoxazoles (figura 7) frente ao transportador MRP1. Essa classe de compostos foi escolhida pois recentemente esses 16 compostos foram testados frente ao transportador ABCG2 (VESGA et al 2021). Vesga e colaboradores (2021) observaram que cinco compostos (A1, C1, C4, D1 e D4) promoveram uma inibição superior a 50% do transporte de mitoxantrona mediado pelo transportador ABCG2, quando testados na concentração de 10 μM . Assim, nesse trabalho foi avaliada a capacidade de inibição de MRP1.

Neste estudo demonstramos que 15 compostos da série foram capazes de inibir o transporte de calceína mediado pelo transportador MRP1 (figura 8). Entretanto, a maioria dos compostos não produziu um efeito máximo de inibição do transportador MRP1 na concentração de 10 μM . De fato, apenas os compostos A1 e D1 produziram um efeito de inibição de 100% do transporte de calceína mediada pelo transportador MRP1 nessa concentração. Para avaliar qual dos dois inibidores (A1 e D1) era o mais promissor, foram determinados os valores de IC_{50} de inibição. Conforme apresentado na figura 9, o A1 apresentou um valor de IC_{50} de 0,58 μM , caracterizando-se como o melhor inibidor desta série de compostos.

Com base na tabela 4 onde estão apresentados inibidores de MRP1, os dados obtidos nesse estudo colocam a classe dos derivados tetrahydroquinolina/4,5-dihidroisoxazoles entre um dos melhores inibidores de MRP1.

MK571 (utilizado a 1 μM , segundo Leier 1994), um receptor antagonista de leucotrieno LTD_4 da classe dos derivados aniônicos da quinolina, é um potente inibidor competitivo de MRP1 (KOLEY 2012). Jones 1989 em estudo visou projetar

potentes receptores antagonistas de LTD₄ de alta afinidade de outra nova classe estrutural (fenilestiril quinolinas).

Ensaio de acúmulo de daunorubicina em células superexpressando MRP1 revelaram que o verapamil e ciclosporina-A promoveram quimiosensibilização das células. Ainda, entre os dois inibidores, o verapamil mostrou-se mais efetivo (GERMANN 1997). Esses resultados corroboram com nosso ensaio de reversão de resistência usando daunorubicina e etoposídeo.

Por mais que verapamil tenha sido inicialmente descrito como um inibidor da P-gp, também foi demonstrado que atua na estimulação do transporte de GSH e na inibição do transporte de LTC₄ por MRP1. No caso do verapamil, importante notar que se tem dois isômeros ((R) – Verapamil e (S) – Verapamil). Ambos atuam como inibidores de MRP1, porém com valores de IC₅₀ diferentes (PERROTTON 2007).

Mutações no transportador MRP1 podem afetar o efeito dos inibidores, uma condição de complexidade crescente quando se leva em consideração casos de atividade inibitória sinérgica, como no caso do derivado de isoxazol tricíclico LY465803 somado de GSH. A substituição de K332 parece afetar a ação de inibidores que possuam uma porção análoga ao GSH, ou sejam dependentes dele, sendo um indicativo de que a ocupação dos sítios P e H simultaneamente pode ter um efeito de modulação de transporte. Já o envolvimento do W1246 é pronunciado nos casos em que o inibidor possui uma quantidade maior de anéis aromáticos, como no caso do LY465803, em que houve redução de 280 vezes na potência inibitória em W1246C (Maeno, 2009). Esse fenômeno pode estar relacionado as interações do tipo Empilhamento-Pi entre esse triptofano e os anéis presentes nos compostos, como identificadas no *docking* de A1 e D1.

Ito e colaboradores (2001) identificaram que a alteração de W1246 reduz o transporte de agentes antitumorais como vincristina e doxorubicina por MRP1. É possível que o transporte de calceína envolva interações similares àquelas do GSH e LTC₄, com dependência de pontes salinas com K332. Outro triptofano, W553 que apresentou pontes de hidrogênio com os inibidores A1 (pose 2) e D1 (pose 1), se mostrou essencial para translocação de GSH, metotrexato e estrona-3-sulfato (KOIKE et al. 2002). Especificamente em relação ao A1, a F594 se mostrou relevante nas poses 2 e 3, sendo esta capaz de reduzir severamente o transporte de E₂17βG, metotrexato, GSH e estrona-3-sulfato quando substituída por alanina (CAMPBELL 2003).

Outro aminoácido do sítio H, M1093 (M1092 em bMrp1), teve sua função recentemente investigada por Conseil *et al.* (2019). Esse resíduo apolar se apresentou próximo de todas as moléculas com as quais se realizou *docking*.

Zhao e colaboradores (2020) proveram outro estudo de grande relevância que reforça os resultados aqui apresentados. Partindo de experimentos *in silico* de dinâmica molecular, pode-se caracterizar a importância dos resíduos W1245, K332 e F594 no transporte de moléculas antitumorais induzido por glutathiona (GSH). Em especial, o resíduo W1245 (verificado nos inibidores A1 e D1) aparenta servir de ponto de contato com os agentes antitumorais, enquanto o K332 demonstra realizar fortes interações com a glutathiona ou moléculas contenham uma porção similar, assim como identificado no *docking* da calceína, com a formação das pontes salinas. O posicionamento conjunto de GSH e da molécula quimioterápica promoveria então uma alteração nas hélices TM11 e TM17, repercutindo em um deslocamento do NBD2 em direção ao NBD1, facilitando o acoplamento de ATP para sua posterior hidrólise juntamente com exportação dos compostos para o ambiente extracelular.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo identificou uma nova classe de compostos como inibidores do transportador MRP1, os derivados de tetrahydroquinilinas/4,5-dihidroisoxazoles. Dois dos 16 compostos testados apresentaram um excelente potencial de inibição, compostos A1 e D1, com valores de IC₅₀ de 0,58 e 2,74 uM respectivamente.

Dentre os dois melhores, o A1 foi o mais promissor, apresentando uma razão terapêutica superior a 170, um indicativo positivo para futuros testes pré-clínicos. Ainda, ambos os inibidores apresentaram baixa citotoxicidade e não foram transportados por MRP1.

A inibição do transportador MRP1 provocada por A1 foi não competitiva, resultado que confirma os dados obtidos em uma análise de *docking* molecular. Por fim, A1 e D1 confirmaram seus resultados de inibição pois foram capazes de potencializar o efeito de quimioterápicos em células expressando o transportador MRP1, indicando seu potencial para seguir em testes pré-clínicos.

8 REFERÊNCIAS

ADAR, Y.; STARK, M.; BRAM, E. E.; et al. Imidazoacridinone-dependent lysosomal photodestruction: A pharmacological Trojan horse approach to eradicate multidrug-resistant cancers. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 4, p. 1–10, 2012. Nature Publishing Group.

BAI, R.; CHEN, N.; LI, L.; et al. Mechanisms of Cancer Resistance to Immunotherapy. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. August, p. 1–12, 2020.

BERNAL, C. C.; VESGA, L. C.; MENDEZ-SÁNCHEZ, S. C.; ROMERO BOHÓRQUEZ, A. R. Synthesis and anticancer activity of new tetrahydroquinoline hybrid derivatives tethered to isoxazoline moiety. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 4, p. 675–689, 2020. Springer US.

BIERMAN, W. F. W.; SCHEFFER, G. L.; SCHOONDERWOERD, A.; et al. Protease inhibitors atazanavir, lopinavir and ritonavir are potent blockers, but poor substrates, of ABC transporters in a broad panel of ABC transporter-overexpressing cell lines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1672–1680, 2010.

BOBROWSKA-HÄGERSTRAND, M.; WRÓBEL, A.; MRÓWCZYŃSKA, L.; et al. Flavonoids as Inhibitors of MRP1-Like Efflux Activity in Human Erythrocytes. A Structure-Activity Relationship Study. **Oncology Research**, v. 13, n. 11, p. 463–469, 2002.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BURGER, A. M.; FIEBIG, H.-H. Preclinical Screening for New Anticancer Agents. **Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, p. 29–44, 2004.

CAMPBELL, J. D.; KOIKE, K.; MOREAU, C.; et al. Molecular Modeling Correctly Predicts the Functional Importance of Phe 594 in Transmembrane Helix 11 of the Multidrug Resistance Protein, MRP1 (ABCC1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 1, p. 463–468, 2004.

CHERN, Y. J.; TAI, I. T. Adaptive response of resistant cancer cells to chemotherapy. **Cancer Biology and Medicine**, v. 17, n. 4, p. 842–863, 2020.

CHRISTENSEN, P. M.; BOSTEEN, M. H.; HAJNY, S.; NIELSEN, L. B.; CHRISTOFFERSEN, C. Apolipoprotein M mediates sphingosine-1-phosphate efflux from erythrocytes /631/45/287/1191 /631/45/287/1196 /692/4017 /13/1 /82/83 /82/16 /96/106 article. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15043-y>>.

COLE, S. P. C.; DOWNES, H. F.; SLOVAK, M. L. Effect of calcium antagonists on the chemosensitivity of two multidrug-resistant human tumour cell lines which do not overexpress P-glycoprotein. **British Journal of Cancer**, v. 59, n. 1, p. 42–46, 1989.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. DEL C. B.; et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

DE BRUIN, M.; MIYAKE, K.; LITMAN, T.; ROBEY, R.; BATES, S. E. Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. **Cancer Letters**, v. 146, n. 2, p. 117–126, 1999.

DE CASTRO SANT' ANNA, C.; JUNIOR, A. G. F.; SOARES, P.; et al. Molecular biology as a tool for the treatment of cancer. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 18, n. 4, p. 457–464, 2018. Springer International Publishing.

EL-AWADY, R.; SALEH, E.; HASHIM, A.; et al. The role of eukaryotic and prokaryotic ABC transporter family in failure of chemotherapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. JAN, p. 1–15, 2017.

FAN, Y. F.; ZHANG, W.; ZENG, L.; et al. Dacomitinib antagonizes multidrug resistance (MDR) in cancer cells by inhibiting the efflux activity of ABCB1 and ABCG2 transporters. **Cancer Letters**, v. 421, p. 186–198, 2018. Elsevier B.V.

FLETCHER, J. I.; HABER, M.; HENDERSON, M. J.; NORRIS, M. D. ABC transporters in cancer: More than just drug efflux pumps. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 2, p. 147–156, 2010. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2789>>.

GAMEIRO, M.; Silva, R.; ROCHA-PEREIRA, C.; CARMO, H.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.D.L.; REMIÃO, F. Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. **Molecules** 2017.

GARRIGUES, A.; ESCARGUEIL, A. E.; ORLOWSKI, S. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10347–10352, 2002.

GEDEON, C.; BEHRAVAN, J.; KOREN, G.; PIQUETTE-MILLER, M. Transport of Glyburide by Placental ABC Transporters: Implications in Fetal Drug Exposure. **Placenta**, v. 27, n. 11–12, p. 1096–1102, 2006.

GEKELER, V.; ISE, W.; SANDERS, K. H.; ULRICH, W. R.; BECK, J. The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1995.

GERMANN, U.A.; FORD, P.J.; SHLYAKHTER, D.; MASON, V.S.; HARDING, M.W. Chemosensitization and drug accumulation effects of VX-710, verapamil, cyclosporin A, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP. **Anticancer Drugs**. 1997 Feb;8(2):141-55. doi: 10.1097/00001813-199702000-00005. PMID: 9073310.

GOMEZ, S.; TABERNACKI, T.; KOPYRA, J.; ROBERTS, P.; CHIAPPINELLI, K. B. Combining epigenetic and immune therapy to overcome cancer resistance. **Seminars in Cancer Biology**, v. 65, n. December 2019, p. 99–113, 2020. Elsevier.

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.

GRUBER, L.; ABDELFAH, S.; FR HLICH, T.; et al. Treatment of multidrug-resistant leukemia cells by novel artemisinin-, egonol-, and thymoquinone-derived hybrid compounds. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 1–13, 2018.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. DE; MENDONÇA, G. A. E. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227–234, 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; FRANCISCO, S. **The Hallmarks of Cancer** Review University of California at San Francisco., v. 100, p. 57–70, 2000.

HEIJN, M.; HOOIJBERG, J. H.; SCHEFFER, G. L.; et al. Anthracyclines modulate multidrug resistance protein (MRP) mediated organic anion transport. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1326, n. 1, p. 12–22, 1997.

HENRICH, C. J.; ROBEY, R. W.; BOKESCH, H. R.; et al. NIH Public Access., v. 6, n. 1, p. 3271–3278, 2009.

HOLLAND, M. L.; PANETTA, J. A.; HOSKINS, J. M.; et al. The effects of cannabinoids on P-glycoprotein transport and expression in multidrug resistant cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 8, p. 1146–1154, 2006.

HOLLÓ, Z.; HOMOLYA, L.; HEGEDÜS, T.; SARKADI, B. Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. **FEBS Letters**, v. 383, n. 1–2, p. 99–104, 1996.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H. Revisão., v. 33, n. 10, p. 2148–2154, 2010.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

ITO, K. I.; OLSEN, S. L.; QIU, W.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Mutation of a Single Conserved Tryptophan in Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1) Results in Loss of Drug Resistance and Selective Loss of Organic Anion Transport. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 15616–15624, 2001. © 2001 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M011246200>>.

IVNITSKI-STEELE, I.; LARSON, R. S.; LOVATO, D. M.; et al. High-throughput flow cytometry to detect selective inhibitors of ABCB1, ABCC1, and ABCG2 transporters. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 6, n. 2, p. 263–276, 2008.

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. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.041>>.

JONES, T. R.; ZAMBONI, R.; BELLEY, M.; et al. Pharmacology of L-660,711 (MK-571): A novel potent and selective leukotriene D4 receptor antagonist. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 17–28, 1989.

KANG, X. LE; ZHANG, M.; WANG, K.; QIAO, X. F.; CHEN, M. H. Molecular cloning, expression pattern of multidrug resistance associated protein 1 (MRP1, ABCC1) gene, and the synergistic effects of verapamil on toxicity of two insecticides in the bird cherry-oat aphid. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 1, p. 65–84, 2016.

KCIUK, M.; MARCINIAK, B.; KONTEK, R. Irinotecan—still an important player in cancer chemotherapy: A comprehensive overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 1–21, 2020.

KILIC, E.; SPUDICH, A.; KILIC, Ü.; et al. ABCC1: A gateway for pharmacological compounds to the ischaemic brain. **Brain**, v. 131, n. 10, p. 2679–2689, 2008.

KOIKE, K.; OLESCHUK, C. J.; HAIMEUR, A.; et al. Multiple membrane-associated tryptophan residues contribute to the transport activity and substrate specificity of the human multidrug resistance protein, MRP1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49495–49503, 2002. © 2002 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M206896200>>.

KOLEY, D.; BARD, A. J. Inhibition of the MRP1-mediated transport of the menadione-glutathione conjugate (thiodione) in HeLa cells as studied by SECM. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 29, p. 11522–11527, 2012.

LE LARGE, T. Y. S.; EL HASSOUNI, B.; KAZEMIER, G.; et al. Multidrug-resistant transporter expression does not always result in drug resistance. **Cancer Science**, v. 109, n. 10, p. 3360–3362, 2018.

LEE, Y. T.; TAN, Y. J.; OON, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 188–196, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>>.

LEE, T. D.; LEE, O. W.; BRIMACOMBE, K. R.; et al. A high-throughput screen of a library of therapeutics identifies cytotoxic substrates of P-glycoprotein. **Molecular Pharmacology**, v. 96, n. 5, p. 629–640, 2019.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; KEPPLER, D. Characterization of the ATP-dependent leukotriene C₄ export carrier in mastocytoma cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 220, n. 2, p. 599–606, 1994.

LESPINE, A.; DUPUY, J.; ORLOWSKI, S.; et al. Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, n. 3, p. 169–179, 2006.

LI, W.; ZHANG, H.; ASSARAF, Y. G.; et al. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. **Drug Resistance Updates**, v. 27, p. 14–29, 2016. Elsevier Ltd.

LINKS, M.; LEWIS, C. Chemoprotectants: A review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 57, n. 3, p. 293–308, 1999.

LUCIA, M. B.; GOLOTTA, C.; RUTELLA, S.; et al. Atazanavir inhibits P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein efflux activity [1]. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 39, n. 5, p. 635–637, 2005.

MAENO, K.; NAKAJIMA, A.; CONSEIL, G.; et al. Molecular basis for reduced estrone sulfate transport and altered modulator sensitivity of transmembrane helix (TM) 6 and TM17 mutants of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 7, p. 1411–1420, 2009.

MAMIDI, R. N. V. S.; DALLAS, S.; SENSENHAUSER, C.; et al. In vitro and physiologically-based pharmacokinetic based assessment of drug–drug interaction potential of canagliflozin. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 83, n. 5, p. 1082–1096, 2017.

MARTINS, I.; ROSA, HVD. Toxicological Approach to Occupational Exposure to Antineoplastic Drugs. **Rev Bras Med Trab**.2004;2(2):118-125

MINDERMAN, H.; O'LOUGHLIN, K. L.; PENDYALA, L.; BAER, M. R. VX-710 (Biricodar) Increases Drug Retention and Enhances Chemosensitivity in Resistant Cells Overexpressing P-Glycoprotein, Multidrug Resistance Protein, and Breast Cancer Resistance Protein. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 5, p. 1826–1834, 2004.

MIYAKE, K.; MICKLEY, L.; LITMAN, T.; et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: Demonstration of homology to ABC transport genes. **Cancer Research**, v. 59, n. 1, p. 8–13, 1999.

MOHAMMAD, I. S.; HE, W.; YIN, L. Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 100, n. December 2017, p. 335–348, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.038>>.

NEPALI, K.; SHARMA, S.; SHARMA, M.; BEDI, P. M. S.; DHAR, K. L. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 77, p. 422–487, 2014. Elsevier Masson SAS.

NORMAN, B. H.; GRUBER, J. M.; HOLLINSHEAD, S. P.; et al. Tricyclic isoxazoles are novel inhibitors of the multidrug resistance protein (MRP1). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 6, p. 883–886, 2002.

OLSON, D. P.; SCADDEN, D. T.; D'AQUILA, R. T.; DE PASQUALE, M. P. The protease inhibitor ritonavir inhibits the functional activity of the multidrug resistance related-protein 1 (MRP-1). **Aids**, v. 16, n. 13, p. 1743–1747, 2002.

ÖZVEGY-LACZKA, C.; HEGEDUS, T.; VÁRADY, G.; et al. High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 1485–1495, 2004.

PADMA, V. V. An overview of targeted cancer therapy. **BioMedicine (Netherlands)**, v. 5, n. 4, p. 1–6, 2015.

PAREDES LARIO, A.; BLANCO GARCÍA, C.; ECHENIQUE ELIZONDO, M. Expresión de proteínas relacionadas con resistencia a múltiples drogas (MDR-proteínas) y resistencia a la quimioterapia en el cáncer de pulmón. **Oncologia**, v. 29, n. 6, p. 245–253, 2006.

PARTRIDGE, A. H.; BURSTEIN, H. J.; WINER, E. P. Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, v. 02115, n. 30, p. 135–142, 2001.

PAYEN, L.; DELUGIN, L.; COURTOIS, A.; et al. Reversal of MRP-mediated multidrug resistance in human lung cancer cells by the antiprogestatin drug RU486. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 258, n. 3, p. 513–518, 1999.

PAYEN, L.; DELUGIN, L.; COURTOIS, A.; et al. The sulphonylurea glibenclamide inhibits multidrug resistance protein (MRP1) activity in human lung cancer cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, n. 3, p. 778–784, 2001.

PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, n. March, p. 52–79, 2015.

PERROTTON, T.; TROMPIER, D.; CHANG, X. B.; DI PIETRO, A.; BAUBICHON-CORTAY, H. (R)- and (S)-verapamil differentially modulate the multidrug-resistant protein MRP1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 43, p. 31542–31548, 2007.

PETERSON, B. G.; TAN, K. W.; OSA-ANDREWS, B.; IRAM, S. H. High-content screening of clinically tested anticancer drugs identifies novel inhibitors of human MRP1 (ABCC1). **Pharmacological Research**, v. 119, p. 313–326, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2017.02.024>>.

REID, G.; WIELINGA, P.; ZELCER, N.; et al. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9244–9249, 2003.

ROBEY, R.W.; SHUKLA, S.; FINLEY, E.M.; OLDHAM, R.K.; BARNETT, D.; AMBUDKAR, S.V.; FOJO, T.; BATES, S.E. Inhibition of P-glycoprotein (ABCB1)- and multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1)-mediated transport by the orally administered inhibitor, CBT-1((R)). *Biochem Pharmacol.* 2008 Mar 15;75(6):1302-12. doi: 10.1016/j.bcp.2007.12.001. Epub 2007 Dec 14. PMID: 18234154; PMCID: PMC2346578.

ROBEY, R. W.; PLUCHINO, K. M.; HALL, M. D.; et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 7, p. 452–464, 2018. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>>.

RIUL, S.; AGUILLAR, O. M. Quimioterapia antineoplásica: revisão da literatura., v. 3, p. 60–67, 1999.

RUMJANEK, V. M.; TRINDADE, G. S.; WAGNER-SOUZA, K.; et al. Multidrug resistance in tumour cells: Characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 1, p. 56–69, 2001.

SALAROGLIO, I. C.; GAZZANO, E.; KOPECKA, J.; et al. New tetrahydroisoquinoline derivatives overcome pgp activity in brain-blood barrier and glioblastoma multiforme in vitro. **Molecules**, v. 23, n. 6, 2018.

SAMPSON, A.; PETERSON, B. G.; TAN, K. W.; IRAM, S. H. Doxorubicin as a fluorescent reporter identifies novel MRP1 (ABCC1) inhibitors missed by calcein-based high content screening of anticancer agents. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 118, n. July, p. 109289, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109289>>.

SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 1, p. 3–29, 2003.

SHARMA, P.; HU-LIESKOVAN, S.; WARGO, J. A.; RIBAS, A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 707–723, 2017. Elsevier Inc.

SHUKLA, S.; CHEN, Z. S.; AMBUDKAR, S. V. Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 1–2, p. 70–80, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2012.01.005>>.

SORF, A.; NOVOTNA, E.; HOFMAN, J.; et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors AZD5438 and R547 show potential for enhancing efficacy of daunorubicin-based anticancer therapy: Interaction with carbonyl-reducing enzymes and ABC transporters. **Biochemical Pharmacology**, v. 163, n. December 2018, p. 290–298, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.035>>.

SUMIZAWA, T.; CHEN, Z. S.; CHUMAN, Y.; et al. Reversal of multidrug resistance-associated protein-mediated drug resistance by the pyridine analog PAK-104P. **Molecular Pharmacology**, v. 51, n. 3, p. 399–405, 1997.

SZAKÁCS, G.; ANNEREAU, J. P.; LABABIDI, S.; et al. Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. **Cancer Cell**, v. 6, n. 2, p. 129–137, 2004.

TAMAKI, A.; IERANO, C.; SZAKACS, G.; ROBEY, R. W.; BATES, S. E. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. **Essays in Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 209–232, 2011.

TAYLOR, N. M. I.; MANOLARIDIS, I.; JACKSON, S. M.; et al. Structure of the human multidrug transporter ABCG2. **Nature**, v. 546, n. 7659, p. 504–509, 2017. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature22345>>.

TEBRAKE, L. H. M.; RUSSEL, F. G. M.; VAN DEN HEUVEL, J. J. M. W.; et al. Inhibitory potential of tuberculosis drugs on ATP-binding cassette drug transporters.

Tuberculosis, v. 96, p. 150–157, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2015.08.004>>.

TERASHI, K.; OKA, M.; SODA, H.; et al. Interactions of ofloxacin and erythromycin with the multidrug resistance protein (MRP) in MRP-overexpressing human leukemia cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1697–1700, 2000.

TOLCHER, A. W.; COWAN, K. H.; SOLOMON, D.; et al. Phase I crossover study of paclitaxel with r-verapamil in patients with metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 4, p. 1173–1184, 1996.

TROMPIER, D.; CHANG, X. B.; BARATTIN, R.; et al. Verapamil and its derivative trigger apoptosis through glutathione extrusion by multidrug resistance protein MRP1. **Cancer Research**, v. 64, n. 14, p. 4950–4956, 2004.

VALDAMERI, G.; GENOUX-BASTIDE, E.; PERES, B.; et al. Substituted chromones as highly potent nontoxic inhibitors, specific for the breast cancer resistance protein. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 966–970, 2012.

VAN ZANDEN, J. J.; DE MUL, A.; WORTELBOER, H. M.; et al. Reversal of in vitro cellular MRP1 and MRP2 mediated vincristine resistance by the flavonoid myricetin. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 11, p. 1657–1665, 2005.

VAN ZANDEN, J. J.; VAN DER WOUDE, H.; VAESSEN, J.; et al. The effect of quercetin phase II metabolism on its MRP1 and MRP2 inhibiting potential. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 2, p. 345–351, 2007.

VERNHET, L.; ALLAIN, N.; PAYEN, L.; et al. Resistance of human multidrug resistance-associated protein 1-overexpressing lung tumor cells to the anticancer drug arsenic trioxide. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 11, p. 1387–1391, 2001.

VESGA, L. C.; KRONENBERGER, T.; TONDURU, A. K.; et al. Tetrahydroquinoline/4,5-Dihydroisoxazole Molecular Hybrids as Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). **ChemMedChem**, p. 1–10, 2021.

VJC. LEMPERS, JJMW. VAN DEN HEUVEL, FGM. RUSSEL, RE. AARNOUTSE, DM. BURGER, RJ. BRÜGGEMANN, J. K. Inhibitory Potential of Antifungal Drugs on ATP-Binding Cassette. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3372–3379, 2016.

WAGHRAY, D.; ZHANG, Q. Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Cancer Treatment. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 12, p. 5108–5121, 2018.

WANG, H.; LI, X.; CHEN, T.; 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.

WANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. **Cancer Drug Resistance**, 2019.

WEEN, M. P.; ARMSTRONG, M. A.; OEHLER, M. K.; RICCIARDELLI, C. The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 96, n. 2, p. 220–256, 2015. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.05.012>>.

WEIDNER, L. D.; ZOGHBI, S. S.; LU, S.; et al. The inhibitor Ko143 is not specific for ABCG2. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 354, n. 3, p. 384–393, 2015.

WEISS, J. Short Communication Nucleoside, Nucleotide, and Non-Nucleoside Reverse ABSTRACT: **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 3, p. 340–344, 2007.

WESOLOWSKA, O.; WISNIEWSKI, J.; DUARTE, N.; FERREIRA, M. J. U.; MICHALAK, K. Inhibition of MRP1 transport activity by phenolic and terpenic compounds isolated from Euphorbia species. **Anticancer Research**, v. 27, n. 6 B, p. 4127–4133, 2007.

XUE, C.; WANG, C.; SUN, Y.; et al. Targeting P-glycoprotein function, p53 and energy metabolism: Combination of metformin and 2-deoxyglucose reverses the multidrug resistance of MCF-7/Dox cells to doxorubicin. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8622–8632, 2017.

ZEINO, M.; PAULSEN, M. S.; ZEHL, M.; et al. Identification of new P-glycoprotein inhibitors derived from cardiogenic steroids. **Biochemical Pharmacology**, v. 93, n. 1, p. 11–24, 2015. Elsevier Inc.

ZHANG, Y.; LATERRA, J.; POMPER, M. G. Hedgehog pathway inhibitor HhAntag691 is a potent inhibitor of ABCG2/BCRP and ABCB1/Pgp. **Neoplasia**, v. 11, n. 1, p. 96–101, 2009.

ZHAO, Z. J.; GAO, X. Y.; ZENG, J. C.; et al. Theoretical Insights into the Cotransport Mechanism of GSH with Anticancer Drugs by MRP1. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 44, p. 9803–9811, 2020.

ZHENG, L. S.; WANG, F.; LI, Y. H.; et al. Vandetanib (Zactima, ZD6474) antagonizes ABCC1- and ABCG2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. 7–11, 2009.

ZHOU, X. F.; COBURN, R. A.; MORRIS, M. E. Effects of new 4-aryl-1,4-dihydropyridines and 4-arylpyridines on drug efflux mediated by multidrug resistance-associated protein 1. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 10, p. 2256–2265, 2005.

ZUGAZAGOITIA, J.; GUEDES, C.; PONCE, S.; et al. Current Challenges in Cancer Treatment. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 7, p. 1551–1566, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>>.