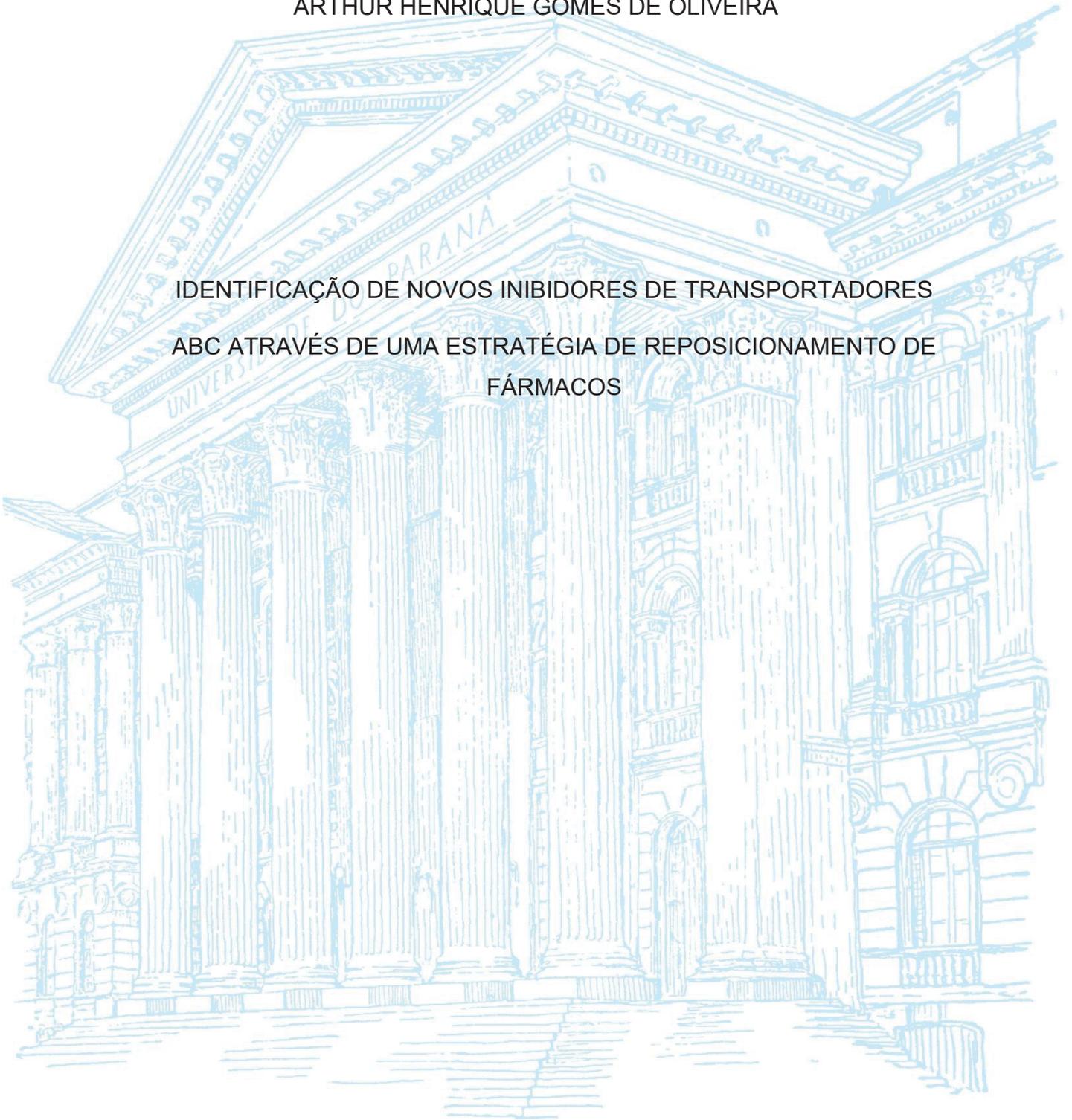


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ARTHUR HENRIQUE GOMES DE OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE TRANSPORTADORES
ABC ATRAVÉS DE UMA ESTRATÉGIA DE REPOSICIONAMENTO DE
FÁRMACOS



CURITIBA 2023

ARTHUR HENRIQUE GOMES DE OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE TRANSPORTADORES
ABC ATRAVÉS DE UMA ESTRATÉGIA DE REPOSICIONAMENTO DE
FÁRMACOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eliane Merlin Rocha

Coorientadores: Prof. Dr. Glaucio Valdameri

Prof^a. Dr^a. Vivian Rotuno Moure

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Oliveira, Arthur Henrique Gomes de
Identificação de novos inibidores de transportes ABC através de
uma estratégia de reposicionamento de fármacos / Arthur Henrique
Gomes de Oliveira. – Curitiba, 2023.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor
de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências
(Bioquímica).

Orientadora: Profª. Drª. Maria Eliane Merlin Rocha.

Coorientadores: Prof. Dr. Glaucio Valdamerl e Profª. Drª. Vivian
Rotuno Moure

1. Câncer. 2. Reposicionamento de medicamentos. 3.

Transportadores de cassetes de ligação de ATP. 5. Mitotano. I. Rocha,
Maria Eliane Merlin, 1965-. II. Valdameri, Glaucio, 1984-. III. Moure,
Vivian Rotuno, 1984-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências
(Bioquímica). V. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ARTHUR HENRIQUE GOMES DE OLIVEIRA** intitulada: **IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE TRANSPORTADORES ABC ATRAVÉS DE UMA ESTRATÉGIA DE REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS**, sob orientação da Profa. Dra. MARIA ELIANE MERLIN ROCHA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de Março de 2023.

Assinatura Eletrônica

16/03/2023 22:29:36.0

MARIA ELIANE MERLIN ROCHA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

16/03/2023 19:11:53.0

LUIZ FERNANDO PEREIRA

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/03/2023 07:39:10.0

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

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: 263993

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 263993

AGRADECIMENTOS

A todos que estiveram presentes durante estes dois anos aos quais me dediquei ao mestrado, mesmo que não fisicamente, dedico estes dignos agradecimentos.

Em primeiro lugar gostaria de iniciar os agradecimentos aos meus pais que não só agora, mas desde sempre se fizeram presentes e incentivaram minha trajetória, mesmo que longe de casa, sempre se dispuseram a me apoiar de todas as formas possíveis, dedico meus mais virtuosos agradecimentos.

A minha orientadora, prof^a Maria Eliane, sempre pela gentileza e receptividade a mim desde 2019, quando ainda aluno de IC de outra instituição, pelos conselhos sempre valorosos e paciência para ensinar.

Aos meus coorientadores, prof. Glaucio e Prof^a. Vivian, aos quais sempre se fizeram presentes na rotina de laboratório, por todos os ensinamentos e momentos de aprendizado, e cafezinhos, são de competente inspiração para o futuro profissional o qual desejo me tornar um dia.

Aos meus amigos e colegas de laboratório LCDR por sempre fazerem do meu dia momentos agradáveis e prazerosos, em especial gostaria de mencionar: Isadora, Julia, Bruna, Marina, Lucas, Ingrid. A vocês em especial um muito obrigado impossível de colocar em um parágrafo.

Aos meus amigos e colegas do laboratório Oxidações Biológicas, por toda receptividade, ajuda e paciência nos momentos em que precisei, em especial: Dainesy, Bruno, André, Mariane e Juliana.

Aos técnicos tanto do LCDR, Carmen, quanto do Oxidações Biológicas, Jainy e Bete, por se disporem a ajudar quando precisei.

Aos meus amigos que estiveram presentes neste momento, mesmo que não diretamente envolvidos pela pesquisa: Fernanda, meu pedacinho de família paranaense, que sempre esteve ao meu lado desde 2017, Cristiano, Pedro, Natan e Nayra.

Aos laboratórios LCDR e Oxidações Biológicas, bem como aos departamentos de Ciências (Bioquímica) e Ciências Farmacêuticas.

As agências de fomento a pesquisa, CAPES, CNPQ e Fundação Araucária.

RESUMO

O câncer é um grupo de mais de 100 doenças. A etiologia multifatorial do câncer está associada a fatores genéticos e ambientais, que desempenham um papel fundamental na oncogênese. Os tratamentos contra o câncer incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A eficácia da quimioterapia pode ser reduzida por diversos mecanismos, entre eles a presença de proteínas na membrana das células cancerígenas, responsáveis pelo efluxo do quimioterápico. Este efluxo é especificamente mediado por transportadores ABC. Os dois transportadores ABC mais importantes responsáveis pela Múltipla resistência a drogas (MDR) no câncer são a P-glicoproteína (P-gp) e ABCG2. Para superar a MDR mediada pelos transportadores ABC, inibidores dessas proteínas têm sido utilizados em associação com os agentes quimioterápicos para aumentar a taxa de resposta terapêutica. Neste trabalho, uma estratégia de reposicionamento de fármacos foi utilizada para identificar novos inibidores de ABCG2. Por meio de uma triagem inicial, entre 45 medicamentos utilizados como inibidores de ABCG2, apenas o mitotano foi identificado como um inibidor. Esta triagem foi realizada em células HEK293-ABCG2 transfectadas de forma estável por citometria de fluxo usando duas concentrações, a concentração de fármaco no plasma (C_p) e outra 10 vezes maior. O mitotano inibiu a atividade dos transportadores, cujos valores de IC_{50} (concentração que produz metade da inibição máxima) foram 36,4 e 298,4 μM para inibição de ABCG2 e P-gp, respectivamente. Ensaio de viabilidade celular revelaram que o mitotano não é transportado por ABCG2 e P-gp. O ensaio conformacional *anticorpo-shift* mostrou que o mitotano aumenta a reorganização anti-ABCG2, em contraste com a ausência de efeito observada na ligação do anticorpo anti-P-gp. A análise do docking molecular revelou um padrão diferente para a ligação do mitotano em ABCG2 e P-gp. Diferentemente da P-gp, onde mitotano e substratos se ligam em sítios diferentes, foi observada uma sobreposição entre mitotano e substratos na mesma região de ABCG2. Finalmente, um ensaio de viabilidade celular usando células HEK293-ABCG2 revelou que a associação do mitotano na concentração de C_p com o metabólito ativo do quimioterápico irinotecano (SN-38), quimiossensibilizou células que superexpressam ABCG2. Juntos, esses resultados sugerem que o mitotano é uma droga promissora para futuros ensaios clínicos em pacientes com câncer apresentando MDR devido à superexpressão de ABCG2.

Palavras-chave: Reposicionamento de fármacos, MDR, transportadores ABC, mitotano.

ABSTRACT

Cancer is a group of more than 100 diseases. The multifactorial etiology of cancer is associated with genetic and environmental factors, that play a key role in oncogenesis. Cancer treatments include surgery, radiotherapy and chemotherapy. The efficacy of chemotherapy can be reduced by several mechanisms, including the presence of proteins in the membrane of cancer cells, responsible for the efflux of the chemotherapeutic agent. This efflux is specifically mediated by ABC transporters. The two most important ABC transporters responsible for MDR in cancer are P-glycoprotein (P-gp) and ABCG2. To overcome the multidrug resistance (MDR) mediated by ABC transporters, inhibitors of these proteins have been used in association with the chemotherapeutic agents to increase the therapeutic response ratio. In this work, a drug repositioning strategy was used to identify new ABCG2 inhibitors. Through an initial screening of 45 drugs as ABCG2 inhibitors, only mitotane was identified as an inhibitor. This screening was performed in stably transfected HEK293-ABCG2 cells by flow cytometry using the plasma drug concentration (C_p) and 10-fold this C_p value. Mitotane also inhibited P-gp activity. The IC_{50} values (concentration that produce half of maximal inhibition) were 36.4 and 298.4 μ M for ABCG2 and P-gp inhibition, respectively. Cell viability assays revealed that mitotane is not transported by ABCG2 and P-gp. The conformational antibody-shift assay showed that mitotane increase the anti-ABCG2 reorganization, in contrast to the absence of effect observed in the binding of the anti-P-gp antibody. Analysis of molecular docking revealed a different pattern for the binding of mitotane on ABCG2 and P-gp. Differently of P-gp, where mitotane and substrates bound at different sites, it was observed an overlap between mitotane and substrates in the same region of ABCG2. Finally, a cell viability assay using HEK293-ABCG2 cells revealed that the association of the mitotane at C_p concentration with the active metabolite of chemotherapy SN-38 chemosensitize cells overexpressing ABCG2. Together, these results suggest that mitotane is a promising drug for future clinical trials in cancer patients showing MDR due the overexpression of ABCG2.

Keywords: drug repositioning, multidrug resistance, ABC transports, ABCG2, mitotane

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Número estimado de novos casos de câncer em 2020 para ambos os sexos e todas as idades	5
FIGURA 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes e estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.....	6
FIGURA 3 – Mecanismo de transporte de substratos pelas proteínas ABC.....	10
FIGURA 4 – Estrutura química do mitotano.....	15
FIGURA 5 – Fórmula para obtenção dos valores em porcentagem.....	20
FIGURA 6 – Efeito do mitotano no transporte de substrato mediado pelos transportadores ABC utilizando células HEK293-ABCG2, NIH3T3-ABCB1 e BHK21-ABCC1.....	25
FIGURA 7 – Curva de Inibição promovida pelo mitotano frente aos transportadores ABCG2.....	26
FIGURA 8 – Ensaio de viabilidade celular para avaliar citotoxicidade e transporte de mitotano mediado por ABCG2 e P-gp.....	28
FIGURA 9 – Alteração da exposição do sítio 5D3 em HEK293-ABCG2 tratada com mitotano (50µM).....	29
FIGURA 10 – Ensaio de anticorpo conformacional 17F9 em NIH3T3-ABCB1.....	30
FIGURA 11 – Docking molecular em ABCG2.....	31
FIGURA 12 – Docking molecular em em P-gp.....	33
FIGURA 13 – Ensaio de reversão na linhagem HEK-293 ABCG2 e HEK-293 <i>Wild Type</i>	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Medicamentos testados no <i>screening</i>	21
TABELA 2 – Resíduos de aminoácidos que realizam interação com ABCG2 em diferentes poses.....	32
TABELA 3 – Resíduos de aminoácidos que realizam interação com P-gp em diferentes poses.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	- Cassete de ligação de ATP
BCRP	- Breast cancer resistance protein / Proteína de resistência ao câncer de mama
CSC	- Cancer stem cells / Células-tronco do câncer
FTC	- Fumitremorgin C / Fumitremorgina C
IC ₅₀	- Concentração do composto que resulta na metade da inibição máxima
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
MBL-II-141	- Cromona 6 g
MDR	- Resistência a múltiplas drogas
MDR1	- Proteína 1 de resistência a múltiplas drogas
MRP1	- Proteína 1 associada à resistência a múltiplas drogas
MTT	- 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide / Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio
mTOR	- mechanistic target of rapamycin kinase/ alvo mecanístico da rapamicina quinase
NBD	- Domínios de ligação de nucleotídeos citoplasmáticos
PBS	- Phosphate buffer saline / Tampão fosfato-salino
P-gp	- Glicoproteína P
TMD	- Domínios transmembrana

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA	3
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 Objetivo geral	3
1.2.2 Objetivos específicos.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Aspectos gerais sobre câncer.....	4
2.2 Estatísticas sobre câncer no mundo e no Brasil.....	5
2.3 Múltipla resistência a drogas (MDR).....	7
2.4 Transportadores ABC.....	8
2.5 Transportadores ABCG2 e P-gp.....	11
2.6 Inibidores dos transportadores ABC.....	12
2.7 Reposicionamento de fármacos.....	13
2.8 Mitotano.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Medicamentos utilizados como inibidores do transportador ABCG2.....	16
3.2 Cultivo celular.....	16
3.3 Ensaio de inibição dos transportadores ABC.....	18
3.4 Ensaio de viabilidade celular	18
3.5 Ensaio de anticorpo conformacional (5D3 e 17F9).....	19
3.6 Docking molecular.....	19
3.7 Cálculo de inibição.....	20
4 RESULTADOS	21
4.1 Screening de novos inibidores do transportador ABCG2 através de uma estratégia de reposicionamento de fármacos.....	21
4.2 IC ₅₀ de inibição do mitotano em ABCG2 e P-gp.....	26
4.3 Ensaio de transporte de mitotano mediado por ABCG2 e P-gp.....	27
4.4 Efeito da ligação do mitotano monitorada pelo uso de anticorpos conformacionais.....	29
4.5 Docking molecular.....	30
4.6 Reversão da resistência mediada por ABCG2 através do uso de mitotano.....	35
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico para um conjunto de mais de 100 doenças, também denominadas neoplasias malignas, que podem iniciar em diversos órgãos e tecidos. Estas doenças apresentam como principal propriedade a proliferação contínua de células alteradas, que podem resultar em metástase e levar a morte (WHO, 2021).

Considerada uma doença multifatorial, o câncer é consequência de fatores internos, como variações genéticas esporádicas e predisposição hereditária, e de fatores externos ou ambientais, como agentes físicos, químicos e biológicos capazes de causar danos ao genoma (INCA, 2021). Estes fatores podem provocar alterações na fisiologia celular que favorecem o desenvolvimento e a progressão tumoral. Entre as principais alterações, estão: autossuficiência das células em relação aos fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, desenvolvimento de mecanismos de evasão da morte celular, potencial ilimitado de replicação, indução de angiogênese direcionada, potencial de invasão tecidual e metástase (LUO *et al.*, 2009).

Diversas são as formas de se tratar o câncer, sendo que, alguns parâmetros devem ser levados em consideração para tal, como tecido de origem e grau de desenvolvimento da doença por exemplo. Dentre os tratamentos mais comumente usados, pode-se elencar a quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, intervenção cirúrgica dentre outras (WHO, 2021). A quimioterapia é uma das intervenções mais utilizadas em diversos tipos de câncer. Entretanto, as células neoplásicas podem apresentar resistência aos princípios ativos utilizados na quimioterapia (DEVITA *et al.*, 2008). Dentre as muitas estratégias de resistência utilizada pela célula, destaca-se a presença de transportadores de membrana capazes de realizar o efluxo de quimioterápicos para fora da célula, assim diminuindo sua concentração no interior e, portanto, sua eficácia (BORST *et al.*, 2002).

Os transportadores ABC (ATP-binding cassette transportes) são proteínas de membrana que podem ser encontrados em todos os seres vivos (HIGGINS *et al.*, 1992; REES *et al.*, 2009). Estes transportadores são capazes de realizar o efluxo de uma variedade de substratos, desempenhando um importante papel na homeostase celular, promovendo a regulação da concentração intracelular de íons, hormônios,

lipídios, xenobióticos e outras pequenas moléculas (ROBEY *et al.*, 2018). Estudos com diversas moléculas vêm sendo realizados quanto à sua capacidade de inibir ou modular a expressão dos transportadores ABC, restaurando a eficácia da quimioterapia (FALASCA *et al.*, 2012).

Dentre os principais transportadores ABC relevantes na clínica, que apresentam comprovada superexpressão em pacientes oncológicos, temos o transportador ABCG2 e a glicoproteína P (P-gp) (TALEVI *et al.*, 2020). O primeiro dos transportadores ABC descoberto foi a P-gp em 1976 por pesquisadores em células ovarianas de hamster chinês (JULIANO *et al.*, 1976). Em 1998 foi identificado o transportador ABCG2, descrito por três grupos de pesquisa diferentes, quase que de maneira simultânea, foi descrito em uma linhagem resistente de câncer de mama (DOYLE *et al.*, 1998). Em 2016, as estruturas dos transportadores ABCG5 e ABCG8 foram publicadas em alta resolução por difração de raios-x de cristal, as estruturas de ABCG5/G8 mostraram haver grande homologia com ABCG2, fornecendo assim um bom modelo para um novo modelo ABCG2 (LEE *et al.*, 2016). Em 2017 enfim a estrutura de ABCG2 foi obtida por microscopia crio-eletrônica (TAYLOR *et al.*, 2017). Para o transportador P-gp, o uso de inibidores já chegou em fase clínica. Atualmente nenhum teste clínico foi realizado utilizando inibidores do transportador ABCG2.

Além do desenvolvimento de inibidores através da síntese de novas moléculas, uma estratégia extremamente atrativa para a pesquisa farmacêutica, devido a redução de tempo e custos, é a estratégia de reposicionamento de fármacos, que foi utilizada neste trabalho (POLGAR *et al.*, 2008). A estratégia de reposicionamento de fármacos já foi utilizada para outras doenças, e se mostrou uma estratégia com diversas vantagens, uma vez que, as drogas utilizadas já possuem aprovação por agências de vigilância, dentre alguns exemplos pode-se citar: Sildenafil, Metformina e doxorubicina (GONZALEZ-FIERRO *et al.*, 2021; RUDRAPAL *et al.*, 2020; REGULSKA *et al.*, 2019).

Neste trabalho foi possível identificar e caracterizar o medicamento mitotano como inibidor para a proteína ABCG2. O mitotano apresentou um valor de IC₅₀ de inibição dentro da faixa de concentração de uso clínico. Além disso, neste trabalho também foi caracterizada a inibição da atividade da P-gp pelo mitotano. Além disso, o mecanismo de inibição através de ensaios de viabilidade celular para estudar o transporte mediado por transportadores ABC, o efeito sobre anticorpos conformacionais e o sítio de ligação através de análises *in silico* de docking molecular

foram verificados. Por fim, foi demonstrado que o mitotano é capaz de promover a reversão do fenótipo de resistência em células que superexpressam ABCG2.

1.1 JUSTIFICATIVA

Devido a relevância que o câncer desempenha no atual cenário de saúde pública, sendo esperados um aumento no número de casos ano após ano, e ainda um dos principais fatores relacionados a falha do tratamento, ser o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas pela superexpressão de proteínas da família ABC, o desenvolvimento de novos inibidores para estas proteínas, tem sido algo de grande relevância, tanto pela síntese de novas moléculas, quanto pela estratégia de reposicionamento de fármacos, sendo assim neste trabalho foram propostos os seguintes objetivos:

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar novos inibidores dos transportadores ABC através de uma estratégia de reposicionamento de fármacos e, utilizando os princípios ativos puros, verificar o mecanismo de ação do inibidor.

1.2.1 Objetivos específicos

- Realizar um *screening* com um acervo de medicamentos para avaliá-los quanto a sua capacidade de inibir o transportador ABCG2;
- Avaliar o efeito do inibidor mais promissor também frente as proteínas P-gp e MRP1
- Determinar o valor de IC₅₀ de inibição do composto mais promissor;
- Comparar o efeito citotóxico em células que superexpressam transportador ABC e comparar o efeito em células parentais;
- Avaliar o efeito do mitotano na ligação de anticorpos conformacionais a regiões dos epítomos nas proteínas ABCG2 e P-gp;
- Realizar um estudo *in silico* através de *docking* molecular para identificar o sítio de ligação dos inibidores nas proteínas ABCG2 e P-gp;
- Avaliar a capacidade de reversão da resistência mediada pelo transportador ABCG2 em ensaios de longa duração;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais sobre o câncer

O câncer é uma doença multifatorial que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. É causado por alterações no DNA de uma célula, que a levam a perder o controle sobre o ciclo celular, resultando em crescimento anormal e descontrolado dessas células (INCA, 2023). O câncer pode ser classificado de várias maneiras, incluindo tecido de origem, como câncer de pele, câncer de pulmão, câncer de mama, entre outros, ou por características celulares específicas, como câncer de células escamosas ou câncer de células germinativas (INCA, 2023).

Existem vários fatores que podem influenciar o desenvolvimento do câncer, dentre esses é possível citar tanto fatores intrínsecos quanto extrínsecos. Alguns dos fatores intrínsecos incluem: a) Mutações genéticas, as mutações no DNA que podem afetar o controle do crescimento celular e a capacidade de uma célula de entrar em apoptose são um dos fatores intrínsecos mais comuns no desenvolvimento do câncer (WU *et al.*, 2018); b) Histórico familiar: a predisposição genética à doença pode ser herdada de pais para filhos (WU *et al.*, 2016); c) Idade: o risco de desenvolver câncer aumenta com a idade, devido a quantidade de multiplicações que as células realizaram durante a vida e a perda da eficácia de mecanismos de reparo a danos no DNA (WU *et al.*, 2016); d) Imunidade comprometida: a imunidade comprometida pode aumentar o risco de desenvolver câncer, uma vez que o sistema imunológico apresenta importante papel no reconhecimento de epítomos celulares nativos (WU *et al.*, 2016).

Alguns dos fatores extrínsecos incluem: a) Tabagismo: o tabagismo é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de muitos tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão, câncer de boca e câncer de garganta (O'KEEFFE *et al.*, 2018); b) Exposição à radiação: a exposição excessiva à radiação pode aumentar o risco de desenvolver câncer, uma vez que esta pode ocasionar danos no DNA que podem ocasionar mutação em caso de um não reparo ou reparo ineficiente (NARAYANAN *et al.*, 2010); c) Alimentação: uma dieta rica em gorduras, carnes vermelhas e açúcares são fatores que podem levar a um aumento do risco de desenvolvimento de câncer (MYSURU SHIVANNA *et al.*, 2016) e d) Exposição a substâncias tóxicas: a exposição a certas substâncias químicas, como produtos carcinogênicos (WU *et al.*, 2016). Portanto, a prevenção do câncer inclui uma combinação de fatores, como estilo de vida saudável, vacinação contra certos tipos

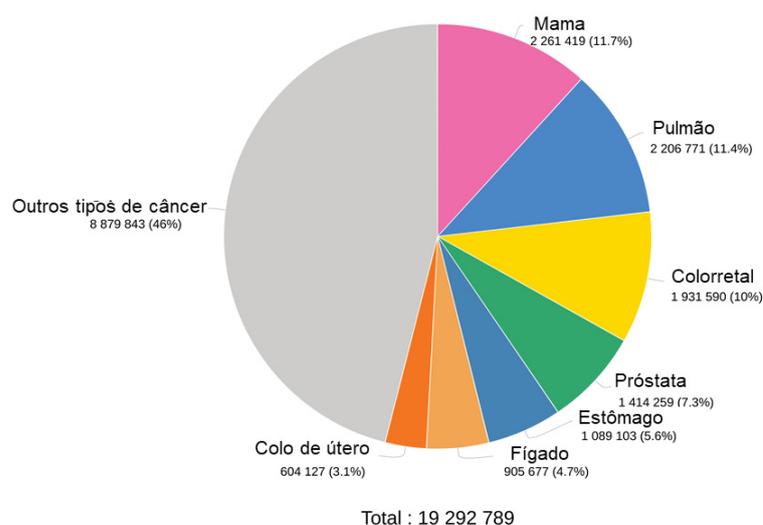
de câncer, detecção precoce através de exames de rastreamento e tratamento eficaz de doenças que possam ser fatores de risco para o desenvolvimento da doença a longo prazo (WHO, 2021).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2022), o câncer é a segunda causa de mortes no mundo e a doença continua a crescer globalmente, sendo considerado o principal problema de saúde pública mundial nos dias atuais (WHO, 2021). Segundo a American Cancer Society para 2023, são projetados cerca de 1.958.310 novos casos para a doença e 609.820 mortes, apenas nos Estados Unidos (SIEGEL *et al.*, 2023)

2.2 Estatísticas sobre câncer no mundo e no Brasil

O câncer é uma das doenças mais prevalentes em todo o mundo e sua incidência tem aumentado ao longo dos anos. A partir das estatísticas mundiais apresentadas pela GLOBOCAN (Global Cancer Observatory), a incidência de câncer varia de acordo com a população, mas alguns dos tipos mais comuns incluem câncer de mama, pulmão, colorretal, próstata e estômago (Figura 1) (GLOBOCAN, 2022).

FIGURA 1 - Número estimado de novos casos de câncer em 2020 para ambos os sexos e todas as idades



LEGENDA: Estimativa global para a incidência de câncer ao redor do mundo. FONTE: Adaptado de GLOBOCAN.

De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2023), a

estimativa no Brasil para o triênio de 2023 a 2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer, 483 mil se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma. Este é estimado como o mais incidente, com 220 mil casos novos (31,3%), seguido pelos cânceres de mama, com 74 mil (10,5%); próstata, com 72 mil (10,2%); cólon e reto, com 46 mil (6,5%); pulmão, com 32 mil (4,6%); e estômago, com 21 mil (3,1%) casos novos. Considerando a incidência por gênero, mama e próstata continuam a ser os tipos de cânceres mais frequentes em mulheres e homens, respectivamente, correspondendo a 74.000 novos casos em mama e 72.000 de próstata (Figura 2). Na infância e adolescência, neuroblastoma é a terceira neoplasia maligna mais comum, após a leucemia e tumores do sistema nervoso central, correspondendo de 8 a 10 % dos casos de neoplasias na criança e a mais frequente no primeiro ano de vida (INCA, 2023).

FIGURA 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes e estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

FONTE: Adaptado de INCA 2023.

O tratamento do câncer é variável a depender do tipo e do estágio da doença, e pode incluir cirurgia, radioterapia, ou a terapia sistêmica farmacológica, que pode envolver uma ampla classe de agentes antineoplásicos (quimioterapia, hormonioterapia, terapia alvo e imunoterapia) (WHO, 2022). Embora pesquisas tenham avançado significativamente na compreensão da biologia do câncer e no desenvolvimento de novos tratamentos, ainda há muito a ser feito para aprimorar as taxas de sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes portadores da doença. A grande taxa de mortalidade é devida principalmente ao diagnóstico tardio da doença que pode implicar no maior acúmulo de mutações, ou mesmo desenvolvimento de metástases, e a não eficácia de resposta aos tratamentos decorrente de resistência

aos agentes quimioterápicos antineoplásicos (TORRE *et al.*, 2016). SKEEL *et al.*, 2011).

2.3 Múltipla resistência a drogas (MDR)

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é o maior obstáculo da abordagem terapêutica para tratamento do câncer (EMRAN *et al.*, 2022). Quando ocorre significa que as células cancerosas se tornaram resistentes a vários tipos de drogas utilizadas na terapia farmacológica, principalmente quimioterápicos antineoplásicos (BUKOWSKI *et al.*, 2020).

A MDR no câncer pode ocorrer por duas vias distintas: 1) A resistência natural que está relacionada às características genéticas próprias de cada indivíduo e ocorre previamente ao tratamento; 2) A resistência adquirida que está relacionada a alterações nas células tumorais e pode ser induzida por uma ampla gama de diferentes mecanismos (HEE CHOI, 2014; GOTTESMAN, 2002).

A MDR é um processo complexo e pode ocorrer por diversos mecanismos. Podem ocorrer alterações genéticas como variações que podem afetar a expressão de genes-alvo e a função de proteínas codificadas por esses genes como por exemplo, a célula tumoral pode apresentar mutações em genes que codificam topoisomerasas ou que aumentam o reparo do DNA, resultando em alterações no alvo da droga ou aumento no reparo do alvo danificado, o que desencadeia a resistência por agentes citotóxicos. Outro processo importante é a reprogramação celular nas quais, células tumorais podem adquirir plasticidade fenotípica, incluindo transição epitelial para mesenquimal (EMT) e aquisição de características de células-tronco cancerígenas (CSCs), pode eventualmente contribuir para a tolerância à citotoxicidade e desenvolvimento de resistência adquirida (PONNUSAMY *et al.*, 2019).

Mudanças no microambiente tumoral também podem contribuir para resistência ao tratamento. O microambiente ao redor das células cancerosas envolve uma população heterogênea de células estromais (fibroblastos, células endoteliais ou mesoteliais, adipócitos ou células estromais derivadas do tecido adiposo, células imunes e células-tronco derivadas da medula óssea). Mudanças no microambiente tumoral podem, por exemplo, afetar interações célula e célula-matriz influenciando a sensibilidade das células cancerígenas à apoptose; liberação local de fatores solúveis

promovendo sobrevivência e crescimento tumoral (*crosstalk* entre células estromais e tumorais); diferenciar células cancerígenas em CSCs (CASTELLS *et al.*, 2012).

Ainda pode-se observar também alteração na farmacocinética dos quimioterápicos antineoplásicos. Algumas células cancerosas como de mama, de leucemias, tumores cerebrais, pulmão, entre outras, podem aumentar a expressão de proteínas da família ABC que dentre outras funções, possuem a capacidade remover as drogas do interior da célula, evitando e diminuindo a concentração intracelular do agente quimioterápico, acarretando na diminuição da efetividade da mesma (BUKOWSKI *et al.*, 2020; BAGULEY, 2010; GILLET *et al.*, 2010).

Dada a complexidade dos mecanismos de resistência e impacto que esse fenômeno tem progressão e mortalidade no câncer, abordagens para contornar MDR podem resultar em melhores estratégias para o tratamento do câncer (EMRAN *et al.*, 2022).

2.4 Transportadores ABC

Os transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporters*) são uma família de proteínas de membrana celular que atuam como bombas moleculares, transportando uma variedade de moléculas, incluindo nutrientes, metabólitos, íons e toxinas, através das membranas celulares. Eles são chamados de "ATP-binding cassette" porque contêm duas regiões de ligação de ATP que são utilizadas para acionar o transporte de substratos através da membrana celular (DASSA; BOUIGE, 2001).

Os transportadores ABC são encontrados em praticamente todos os organismos, desde bactérias até seres humanos, e estão envolvidos em muitos processos biológicos importantes, incluindo o transporte de substâncias através da barreira hematoencefálica e placentária, a eliminação de toxinas e medicamentos do corpo, a regulação do fluxo de íons e nutrientes nas células, e a resistência a medicamentos em células cancerígenas (HIGGINS, 1992). A maioria destes transportadores tem como função realizar o transporte de moléculas através de membranas biológicas unidirecionalmente para fora da célula (SAURIN *et al.*, 1999).

Desde a descoberta das proteínas ABC, diversos estudos foram realizados para melhor compreender seu papel na fisiologia humana (HYDE *et al.*, 1990). Foi descoberto que algumas proteínas ABC desempenham um papel importante no

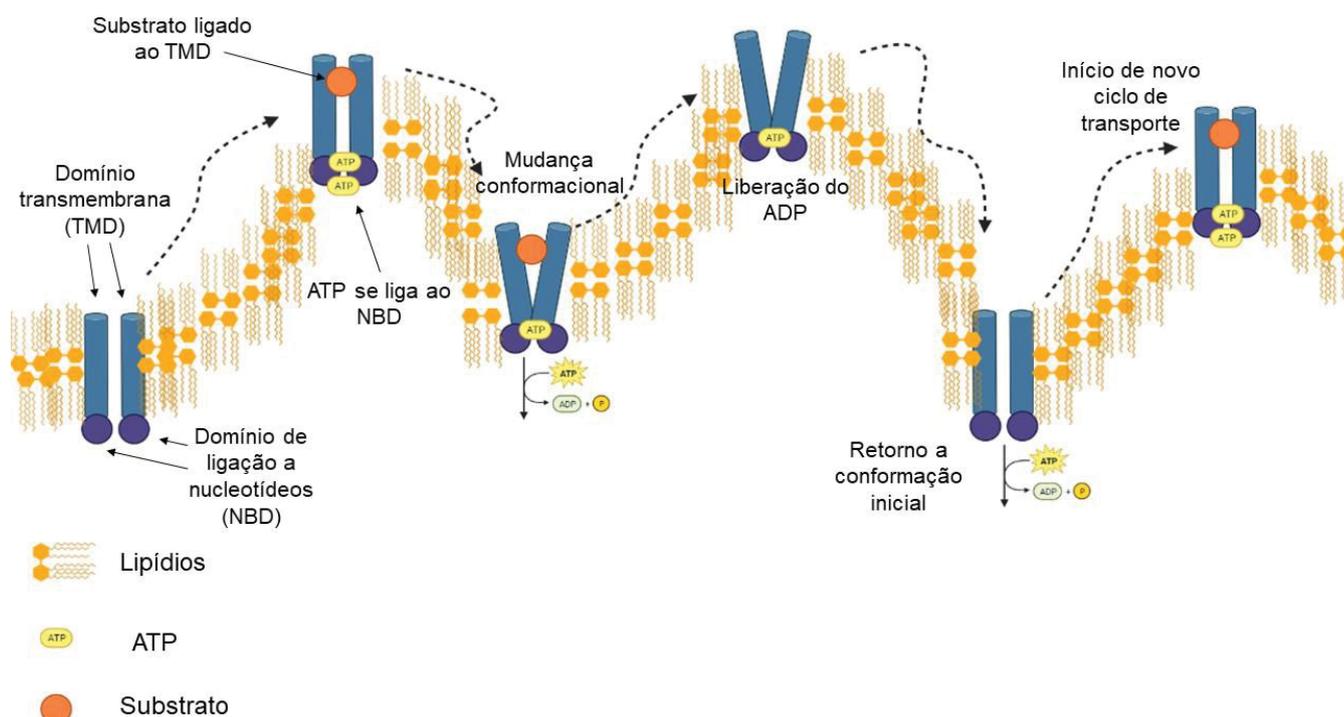
desenvolvimento do câncer e na resistência a tratamentos quimioterápicos. Algumas proteínas ABC, como a P-glicoproteína (P-gp, também conhecida como MDR1), codificada pelo gene *ABCB1*, a proteína de resistência a múltiplos medicamentos relacionados (MRP1), codificada pelo gene *ABCC1*, e a proteína de resistência a múltiplos medicamentos associada a câncer de mama ABCG2 ou (BCRP), codificada pelo gene *ABCG2* são as três principais proteínas conhecidas por conferir resistência a medicamentos em células cancerígenas (MIRSKI, *et al.*, 1987; ROBEY *et al.*, 2018).

A partir da correlação de proteínas ABC no desenvolvimento de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR), houve o aumento do interesse de se estudar o papel dos transportadores na resistência relatada na clínica, focando na identificação de quais medicamentos eram capazes de ser reconhecidos como substratos para estas proteínas e desenvolvimento de estratégias para driblar estes mecanismos de ação (ROBEY *et al.*, 2018).

Sabe-se que atualmente são encontrados cerca de 48 genes codificantes para proteínas ABC, em sua maioria, transportadores. Essas proteínas são classificadas em sete subfamílias (ABCA a ABCG), com base na estrutura e função de cada proteína. Cada subfamília é composta por diferentes proteínas ABC que desempenham funções específicas em processos biológicos (AMBUDKAR *et al.*, 2003; SZAKACS *et al.*, 2006).

Estruturalmente as proteínas ABC são constituídas por quatro domínios principais: dois domínios transmembrana (TMDs) e dois domínios de ligação a ATP (NBDs). Os domínios transmembrana são compostos de seis a dez hélices alfa transmembranares que atravessam a membrana plasmática da célula. Esses domínios fornecem o canal através do qual os substratos são transportados. Os domínios de ligação a ATP são responsáveis pela hidrólise do ATP, fornecendo a energia necessária para o transporte de substratos através dos domínios transmembrana. Esses domínios contêm sequências altamente conservadas conhecidas como "motivos de dobramento ABC" que se ligam ao ATP (Fig. 3) (ROBEY *et al.*, 2018).

FIGURA 3 - Mecanismo de transporte de substratos pelas proteínas ABC



LEGENDA: Ciclo de transporte de substratos realizado pelas proteínas ABC.
 FONTE: O autor 2023.

O ciclo de transporte realizado pelas proteínas ABC consiste em 3 etapas principais: (1) Ligação de duas moléculas de ATP e dimerização dos dois NBDs; (2) Mudanças conformacionais que levam a alteração e aumento de afinidade do substrato, a alteração é denominada (*inward-facing*), para o estado (*outward-facing*) de menor afinidade pelo substrato, voltada para fora, este processo cria um canal de passagem para o substrato e (3) A hidrólise da segunda molécula de ATP ligada retorna a conformação inicial do transportador, permitindo que o mesmo refaça o ciclo de transporte (REES *et al.*, 2009; SRIKANT *et al.*, 2019).

2.5 Transportadores P-gp e ABCG2

A P-gp foi originalmente descoberta na década de 1970, quando pesquisadores estavam investigando a resistência a múltiplas drogas em células tumorais de camundongos. Eles descobriram que essas células eram capazes de se tornar resistentes a múltiplos agentes quimioterápicos e identificaram uma proteína de membrana celular que estava presente em células resistentes, mas não em células sensíveis a drogas (WAGHRAY *et al.*, 2017). Posteriormente, descobriu-se que essa

proteína era um transportador de membrana celular capaz de remover quimioterápicos da célula antes que eles pudessem exercer seu efeito terapêutico. Essa proteína foi denominada proteína de resistência a múltiplas drogas, ou MDR1, codificada pelo gene *ABCB1* e mais tarde foi identificada como a P-gp (WAGHRAY *et al.*, 2017).

Desde a sua descoberta, a P-gp tem sido objeto de intensa pesquisa em muitas áreas da biologia celular e molecular, incluindo a biologia do câncer, por ter sido a primeira proteína ABC descoberta é também a que possui a maior quantidade de inibidores identificados e testados *in vitro* e *in vivo* (PALMEIRA *et al.*, 2012).

A proteína ABCG2 foi descoberta independentemente por três grupos de pesquisa distintos, quase ao mesmo tempo. O grupo de pesquisa de Doyle e colaboradores identificaram e nomearam o gene de resistência que codificava para a proteína como *BCRP*, expresso em uma linhagem de câncer de mama MCF-7 (DOYLE *et al.*, 1998). Em sequência o artigo de Allikmets e colaboradores (1998) relatou um transportador idêntico nomeado de ABCP com grande expressão relatada na placenta. Rabindran e colaboradores (1998) encontraram o gene denominado *MXR*, utilizando o tratamento com mitoxantrona e S1-M1-80 realizado em uma linhagem celular de carcinoma de cólon S1-M1. Quando as sequências identificadas pelos três grupos puderam ser comparadas, foi notada grande analogia entre elas, então esta proteína foi alocada no grupo G, da família ABC, e denominada ABCG2 (ROBEY *et al.*, 2009). A estrutura tridimensional do ABCG2 foi resolvida por cristalografia de raios-X, o que permitiu uma compreensão mais detalhada do mecanismo de transporte da proteína. A estrutura revelou que o canal transmembranar do ABCG2 é composto por dois domínios transmembranares que se dobram em uma configuração semelhante a um "V" invertido, com um domínio maior no topo e um menor na base. Os TMDs são conectados por laços que formam uma "ponte" entre eles. Além disso, estudos recentes sugerem que o ABCG2 pode formar dímeros ou oligômeros, o que pode ter implicações importantes para a sua atividade de transporte e regulação (SARKADI *et al.*, 2020).

2.6 Inibidores dos transportadores ABC

Inibidores dos transportadores ABC são compostos químicos que agem inibindo a função dos transportadores ABC. A atividade excessiva desses transportadores pode reduzir a eficácia de certos medicamentos e, portanto, inibidores dos transportadores ABC são utilizados para aumentar a concentração de fármacos no local desejado, melhorando sua eficácia (FALASCA *et al.*, 2012).

Se tratando de inibidores, é importante salientar que estes devem possuir algumas características principais para que sejam eficazes na inibição das proteínas ABC, algumas dessas características são: (A) Especificidade: o inibidor deve ser seletivo para a proteína ABC que se deseja inibir, sem afetar outras proteínas transportadoras ou processos celulares importantes; (B) Potência: o inibidor deve ser capaz de inibir a função da proteína ABC de forma eficiente, mesmo em baixas concentrações. (C) Estabilidade: o inibidor deve ser estável em diferentes condições, como pH, temperatura e presença de outras moléculas; (D) Baixa toxicidade: o inibidor deve ser pouco tóxico para as células e não causar efeitos colaterais indesejados; (E) Farmacocinética favorável: o inibidor deve ser capaz de ser absorvido, distribuído, metabolizado e eliminado pelo organismo de forma adequada, para que possa alcançar seu alvo e exercer sua ação de forma eficaz (BOUMENDJEL *et al.*, 2011).

Embora os inibidores de proteínas ABC tenham um papel importante no tratamento de diversas doenças, há alguns contrapontos ao seu uso na clínica que devem ser considerados. Existem pesquisadores que argumentam que a utilização destes inibidores pode ser prejudicial para com outros processos celulares, levando a efeitos colaterais indesejados. Entretanto, a utilização de inibidores específicos é algo que deve ser explorado, uma vez que, devido a natureza promiscua destes transportadores, um mesmo substrato pode ser reconhecido por mais de um transportador ABC, não alterando a homeostase de forma mais significativa, quando utilizado um inibidor específico para um transportador (ROBERT *et al.*, 2003).

Por ter sido o primeiro transportador ABC descoberto, a P-gp é a proteína que possui a maior quantidade de inibidores testados na clínica, estes inibidores se encontram atualmente na terceira geração. A primeira geração tem como principais representantes o verapamil, quinidina e a ciclosporina, esta primeira geração de inibidores consistem em todos de fármacos reposicionados, a segunda geração

destacam-se o elacridar, valsopodar e biricodar, e a terceira geração sozuquidar, laniquidar e dofequidar (KOLITZ *et al.*, 2004; CRIPE *et al.*, 2010).

Existem diversas controvérsias nos estudos clínicos que utilizaram os inibidores na clínica, uma vez que alguns parâmetros importantes não foram considerados, como o monitoramento do nível de expressão de P-gp, ou a presença de outros transportadores como ABCG2 ou MRP1 (TAMAKI *et al.*, 2011). O Transportador ABCG2, por sua vez, embora tenha alguns inibidores potentes desenvolvidos, como FTC, e posteriormente um derivado mais potente e menos tóxico deste, o Ko143, até o presente momento, não possui nenhum teste clínico utilizando inibidores para esta proteína (BOUMENDJEL *et al.*, 2011).

Atualmente na literatura o inibidor testado que mais se destaca para esta proteína é o MBL-II-141, um derivado de cromona, que teve testes *in vivo* realizados por Honorat e colaboradores (2014), apresentando bons resultados e cumprindo vários pré-requisitos desejados para se tornar um inibidor em potencial. Vale destacar que estudos clínicos são estudos de grande complexidade e que exigem conhecimento sedimentado baseado em estudos *in vitro* e *in vivo*.

2.7 Reposicionamento de fármacos

O reposicionamento de drogas é uma estratégia em que uma droga já aprovada ou em uso para uma doença é investigada para o tratamento de outra doença. Isso pode ser feito com base em evidências científicas que sugerem que a droga pode ter atividade contra outras condições além daquela para a qual foi originalmente aprovada (TALEVI *et al.*, 2020).

Há vários exemplos de drogas que foram reposicionadas para o tratamento de diferentes tipos de doenças, alguns exemplos a serem citados. Dentre alguns exemplos bem sucedidos desta estratégia pode-se citar: (i) Sildenafil, que foi aprovado para o tratamento da disfunção erétil e é usado atualmente para o tratamento de hipertensão pulmonar (ASHBURN *et al.*, 2004); (ii) Metformina: que foi aprovado para o tratamento do diabetes tipo 2 é atualmente um forte candidato para o tratamento de alguns tipos de câncer, uma vez que possui ação direta na via de produção energética, levando a aumentos de monofosfato de adenosina (AMP) e ativação da proteína quinase ativadora de AMP (AMPK), que inibe a proteína mTOR e a proliferação celular (ZHOU *et al.*, 2001); (iii) Talidomida, que inicialmente foi um

medicamento desenvolvido com a finalidade de uso como sedativo, posteriormente foram descobertas outros efeitos biológicos, que permitiram sua utilização no tratamento de mieloma múltiplo e também da AIDS (SINGHAL *et al.*, 1999; KAPLAN *et al.*, 2000).

Dentro do contexto de reposicionamento de fármacos como inibidores de transportadores ABC, podemos citar o que talvez seja o inibidor de ABCG2 mais promissor para seguir em testes clínicos, o Febuxostat® (ZATTONI *et al.*, 2022). Os estudos envolvendo a utilização de febuxostat demonstram que este é um medicamento bastante promissor para reposicionamento como inibidor de ABCG2.

O reposicionamento de drogas pode oferecer vários benefícios, incluindo acelerar o tempo necessário para desenvolver novas terapias, diminuir os custos e os riscos associados ao desenvolvimento de novos fármacos e fornecer tratamentos mais rápidos e acessíveis para pacientes com doenças graves (TALEVI *et al.*, 2020).

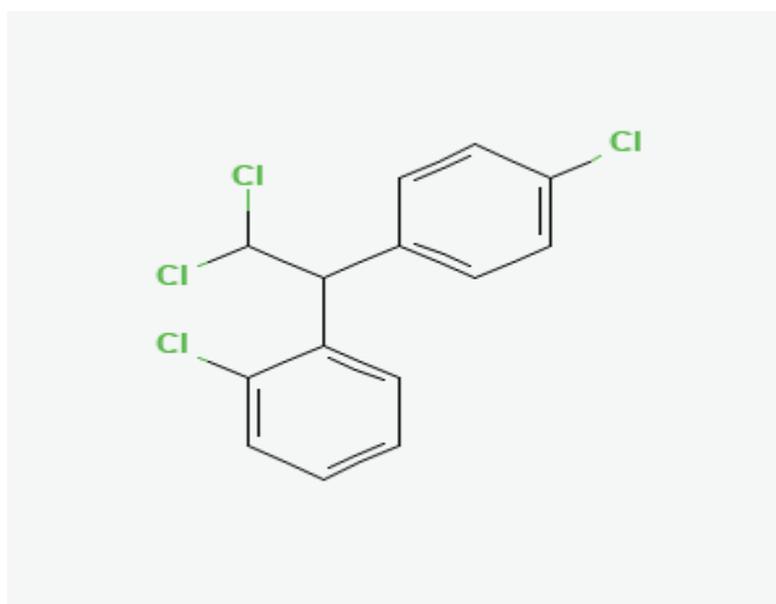
2.8 Mitotano

O mitotano, 1-chloro-2-[2,2-dichloro-1-(4-chlorophenyl)ethyl]benzene (IUPAC), que possui a fórmula molecular C₁₄H₁₀Cl₄, é um derivado do inseticida DDT e comercialmente disponível como Lysodren® (Lysodren o,p'-DDD) (Figura 4) é o único medicamento aprovado para o tratamento do carcinoma adrenocortical avançado e é cada vez mais utilizado como terapia adjuvante pós-operatória. A ação do mitotano envolve a desregulação das atividades das enzimas dos citocromos P₄₅₀ envolvidos na síntese de hormônios esteroides, despolarização das membranas mitocondriais e acúmulo de colesterol livre, levando à morte celular (CORSO *et al.*, 2021).

Embora se saiba que o mitotano afeta as células de córtex adrenal e prejudica a esteroidogênese, seu exato mecanismo de ação ainda não está completamente entendido. Os modelos celulares mais utilizados para estudos com mitotano são as linhagens celulares isoladas de glândula adrenal de pacientes com câncer H295 e SW13. No entanto, os resultados divergentes obtidos em linhagens celulares presumivelmente idênticas destacam a necessidade de um modelo *in vitro* estável e/ou uma metodologia padrão para realizar experimentos na linhagem H295. A presença de vários alvos enzimáticos responsivos ao mitotano nas membranas mitocondriais, causa alteração progressiva na estrutura mitocondrial quando as células são expostas a esse quimioterápico (LO IACONO *et al.*, 2021).

A dose inicial recomendada de mitotano é de 2 g a 6 g por via oral, em três ou quatro doses divididas por dia. Há um aumento das doses gradativamente para atingir uma concentração sanguínea de 14 a 20 mg/L, ou conforme tolerado (CUNHA, 2022). Outras reações adversas também são descritas como: crise adrenal no cenário de choque ou trauma grave, toxicidade sobre o sistema nervoso central, insuficiência adrenal e presença de macrocistos ovarianos.

FIGURA 4 - Estrutura química do mitotano



Fonte: PubChem.

Segundo estudos de WASZUT e colaboradores (2017), o mitotano é convertido em sua forma tóxica por enzimas mitocondriais, local no qual este iniciaria seus efeitos citotóxicos, alterando assim a permeabilidade de membrana externa da mitocôndria, o que levaria a ativação de caspase 9 e sua via apoptótica. Sabe-se que o mitotano é convertido no fígado em metabólitos tóxicos que se acumulam nas células da camada externa da glândula adrenal (córtex). Esses metabólitos interferem no processo normal de síntese de esteroides, que é a função principal do córtex adrenal. Especificamente, o mitotano afeta a enzima CYP11A1, que está envolvida na produção do hormônio esteroide e precursor pregnenolona, e também interfere na síntese do cortisol (WASZUT *et al.*, 2017).

Até o presente momento, não existem estudos quanto a capacidade do medicamento mitotano como inibidor da proteína ABCG2. Neste trabalho este foi possível avaliar a hipótese desta inibição.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais e preparo das soluções dos medicamentos utilizados como inibidores do transportador ABCG2 e de soluções do mitotano puro

Os anticorpos conformacionais 5D3 e 17F9 foram adquiridos da BD pharmingentm, o inibidor Ko143 e o metabólito ativo do irinotecano SN-38 foram adquiridos da Abcam. Os reagentes para cultivo celular, meio DMEM alta glicose, penicilina/streptomicina, anfotericina B, soro fetal bovino e tripsina foram adquiridos da empresa Gibco. Por fim os substratos Hoescht33342, Rodamina123, Calceína AM e inibidores Elacridar e MK571 foram adquiridos da empresa Invitrogen. Demais reagentes adquiridos de outras empresas foram utilizados nos seus mais altos graus de pureza.

Os medicamentos utilizados para as análises iniciais de inibição dos transportadores ABCG2 foram diluídos em DMSO Sigma, em tubos Eppendorff de 1,5 mL, todos em estoques a uma concentração de 10 mM, armazenados em freezer a -20°C.

O mitotano puro (Merck - Sigma Aldrich) foi diluído em DMSO para solução estoque e armazenado no freezer a -20°C Para posterior utilização. A utilização nos experimentos era de até 1% de DMSO total no meio de cultivo. Também realizados controles com a presença e ausência de DMSO na amostra.

3.2 Cultivo celular

Células de morfologia epitelial isoladas de rim de embrião humano HEK293 (selvagem) e células HEK293 transfectadas de forma estável com o gene *ABCG2* (HEK293-*ABCG2*), células BHK21 de rim de hamster (selvagem) e células BHK21 transfectadas de maneiras estável com o gene *ABCC1*, células de fibroblastos isoladas de embrião de camundongo NIH/Swiss NIH3T3 (selvagem) e células NIH3T3 transfectadas de forma estável com o gene *ABCB1* (NIH3T3-*ABCB1*) foram fornecidos gentilmente pelo Dr. Attilio Di Pietro (IBCP, Lion, França). Todas as células foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM alta glicose) suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina e com 0,75 mg/mL G418 (HEK293-*ABCG2*) ou colchicina 60 ng/mL (NIH3T3-*ABCB1*) a 37 °C em 5% de CO₂.

3.3 Ensaio de inibição dos transportadores ABC

A capacidade das drogas de inibir a função de transporte das proteínas ABC foi avaliada usando substratos fluorescentes por citometria de fluxo. As células HEK293-*ABCG2*, NIH3T3-*ABCB1* e BHK21-*ABCC1* ($1,5 \times 10^5$) foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após 48 horas de adesão, as células foram incubadas com substratos fluorescentes como descrito nas legendas das figuras 6 e 7, como: Hoechst 33342 a 3 μM , rodamina 123 a 10 μM e Calceína AM a 0,15 μM por 45 minutos a 37°C em 5% de CO₂ na presença ou ausência de diferentes concentrações dos compostos. Após a incubação as células foram centrifugadas (2.000 x g por 5 min) e ressuspensas com 300 μL de tampão fosfato salino (PBS) e mantidos em gelo até a análise por citometria de fluxo. Foram coletados 10.000 eventos de cada amostra e as intensidades medianas de fluorescência usadas para os cálculos. O controle de 100% de inibição foi obtido pela fluorescência das células HEK293-*ABCG2* incubadas inibidor de referência Ko143 (ROBEY *et al.*, 2011).

Os dados de fluorescência do substrato intracelular foram adquiridos usando um FACS Celesta 85 (equipado com três lasers: 355, 405 e 488 nm) ou um FACS Calibur (equipado com dois lasers: 488 e 635 nm) citômetro de fluxo.

A percentagem de inibição foi calculada usando células HEK293-*ABCG2*, NIH3T3-*ABCB1* e BHK21-*ABCC1* na presença do substrato e do inibidor de referência Ko143 (1 μM), Elacridar (1 μM) e MK571 (1 μM), para alcançar 100% de inibição. Em todos os experimentos, pelo menos três réplicas independentes foram usadas e os valores de IC₅₀ foram calculados usando o software GraphPad prism versão 6.01.

A partir desta mesma metodologia também foi possível realizar o ensaio de IC₅₀, para este ensaio, utilizam-se os mesmos substratos e inibidores de referência para cada uma das células, variando por sua vez a concentração dos compostos testados, de uma concentração baixa, em que não há inibição, até a concentração de máxima inibição do composto frente a proteína. A partir deste faixa de concentração foi possível gerar a curva para cálculo do IC₅₀.

3.4 Ensaio de viabilidade celular

As células foram plaqueadas a uma concentração de $(2,0 \times 10^4$ células/poço) em uma placa de 96 poços e incubadas por 24h para adesão celular. Para avaliar a citotoxicidade celular por MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-ensaio de brometo de il]-2,5 difenil tetrazólio), as células foram tratados com aumento da concentração da droga e incubados por 72 h.

Após esse período, o meio de cultivo foi descartado e a mono camada de células lavada com PBS (100 μ L), seguida de incubação a 37°C com solução de MTT (100 μ L de solução 0,5 mg/mL em PBS) por 4 h. Então a solução foi descartada e os cristais de formazan dissolvidos em 100 μ L de etanol/DMSO (1:1). A absorbância foi medida usando um leitor de microplacas a 595 nm (Bio-Rad iMark).

A partir desta metodologia foram obtidos os dados referentes a citotoxicidade dos compostos frente as linhagens NIH3T3 e NIH3T3-*ABCB1* e HEK293 e HEK293-*ABCG2*.

A partir desta mesma metodologia também foi possível realizar o ensaio de longa duração para avaliar a reversão ao fenótipo de resistência conferido pela superexpressão de *ABCG2*.

Para este ensaio foram utilizadas as células HEK293 e HEK293-*ABCG2*. Estas células foram plaqueadas em placas de 96 poços ($2,0 \times 10^4$ células/poço), estas células foram divididas em alguns grupos, a): sem tratamento, b): com adição de SN-38 c): adição de SN-38 + mitotano d): somente com mitotano. As células foram tratadas com uma dose fixa de mitotano 50 μ M e uma dose fixa de SN-38, metabólito ativo do quimioterápico irinotecano.

Passadas 74 horas após a adição do tratamento, foi adicionado o reagente de MTT, deixadas em incubação por 4 horas, realizada a retirada do tratamento, os cristais de formazan formados foram solubilizados em uma solução 1:1 de DMSO/EtOH. A leitura dos resultados foi realizada por leitor de microplaca em absorbância a 595 nm.

3.5 Ensaio de anticorpo conformacional (5D3 e 17F9)

As células HEK293-*ABCG2* e NIH3T3-*ABCB1* foram cultivadas a 37°C em 5% de CO₂ até aproximadamente 90% de confluência, depois desadidas e separados em tubos com 5 x 10⁵ (10⁵) células/tubo.

As células foram centrifugadas a 2000 x g por 5 min e o sobrenadante descartado. O sedimento celular resultante foi suspenso em PBS (100 µL) contendo 40 µg/mL de BSA. As amostras foram incubadas com o inibidor por 10 minutos a 37°C. Após este período, o anticorpo primário anti-*ABCG2* humano clone 5D3 e anticorpo primário anti-P-gp humano clone 17F9 (BD Pharmingen – diluição 1:100) foi adicionado a cada amostra e incubado por 30 min a 37°C. As células foram centrifugadas e o sobrenadante descartado.

As células foram suspensas em PBS (100 µL) e o anticorpo secundário foi adicionado (PE anti-mouse, Abcam – diluição 1:200). As amostras foram incubadas a 37°C por 30 min, posterior a esta incubação a amostra foi centrifugada e o *pellet* celular foi suspenso em 300 µL de PBS. Os dados foram analisados por citometria de fluxo e pelo menos 10.000 eventos foram coletados.

3.6 Docking molecular

Para o *docking* molecular, foram selecionadas as estruturas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) ID: 6VXI e 6QEX, correspondentes aos transportadores *ABCG2* e *ABCB1*. Ambas as estruturas passaram por uma otimização utilizando o software Maestro 13.0 Academic (SCHRÖDINGER, 2021), utilizando o módulo PROPKA (OLSSON *et al.*, 2011; SØNDERGAARD *et al.*, 2011) para correção das cargas das cadeias laterais no pH fisiológico 7,4. A estrutura 6VXI teve cadeias laterais faltantes completadas por meio do algoritmo PRIME. Para obtenção das estruturas químicas dos ligantes, foi utilizada a ZINC Database (STERLING; IRWIN, 2015), na qual foi inserido os termos-chave de busca “Mitotane”, “SN-38”, “Hoechst 33342” e “Rhodamine 123”.

O arquivo .sdf correspondente a cada composto foi baixado e seguiu-se para preparação, consistindo na pré-otimização de estrutura tridimensional por meio do software Avogadro 1.2.0 (método MMFF94), juntamente com a protonação correspondente ao pH 7.4. Seguiu-se, então, para a otimização final de geometria

com MOPAC2016, utilizando o método semi-empírico PM7 (STEWART, J. P., 2016). Os arquivos das proteínas e compostos foram preparados para o *docking* com a ferramenta ADTools 1.5.7 (MORRIS et al., 2009), tendo somente seus hidrogênios polares mantidos e sendo convertidas para o formato pqbqt. Finalmente, seguiu-se para a execução do docking no AutoDock Vina 1.2.3 (EBERHARDT et al., 2021), com os seguintes parâmetros: *exhaustiveness* = 75, *energy_range* = 2 e *num_modes* = 20. As coordenadas e dimensões de gridbox foram de X= -0.181 Y= -0.222 Z= 0.571 40x40x40Å para 6VXI e de X= 172.853 Y= 165.021 Z= 171.281 36x52x58Å para 6QEX.

A visualização e análise dos resultados se deu nos softwares PyMOL 2.5 open-source e Maestro 13.0, nos quais foram avaliadas as regiões de ligação e as interações intermoleculares de cada molécula. Para a geração de figuras, convencionou-se a seleção de aminoácidos em até 4 Å de distância dos átomos nas moléculas de interesse.

Esta análise foi realizada em colaboração com o aluno de iniciação científica Gustavo Scheiffer que possui expertise na área.

3.7 Cálculo de inibição

Para o cálculo da porcentagem de inibição é utilizado uma fórmula, na qual se utiliza os dados brutos de fluorescência do substrato, do inibidor de referência de cada uma das células, e dos valores encontrados para cada um dos compostos testados (FIG. 5). Estes dados são obtidos a partir dos resultados gerados por citometria de fluxo

FIGURA 5 – Fórmula para obtenção dos valores em porcentagem

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{Fluorescência composto} - \text{Fluorescência substrato}) \times 100}{(\text{Fluorescência do inibidor de referência} - \text{Fluorescência do substrato})}$$

Fonte: O autor 2023.

A partir dos valores em porcentagem os dados foram levados ao GraphPad prism versão 6.01.

3.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas usando teste de comparação de grupos

múltiplos de Tukey. $P < 0,05$ foi considerado significativo. Análise foi realizada no software GraphPad prism versão 6.01.

4. RESULTADOS

4.1 Screening de novos inibidores do transportador ABCG2 através de uma estratégia de reposicionamento de fármacos

Neste estudo, 45 medicamentos comercialmente disponíveis no Brasil foram escolhidos de forma randômica para serem testados como inibidores do transportador ABCG2. A capacidade de inibição da atividade do transportador ABCG2 foi avaliada em células transfectadas de maneira estável para superexpressar ABCG2, células HEK293-ABCG2. Essas células foram expostas simultaneamente aos medicamentos e um substrato fluorescente do transportador ABCG2, permitindo assim a avaliação do acúmulo intracelular desse substrato na presença e ausência dos medicamentos. Um controle positivo de inibição (100% de inibição) foi realizado utilizando o composto chamado Ko143. Como é possível observar na tabela 1, os medicamentos foram testados como inibidores de ABCG2 em duas concentrações: (i) concentração plasmática obtida através de revisão bibliográfica, e (ii) concentração 10 vezes superior a plasmática.

TABELA 1 - Medicamentos testados no *screening*

Classe Farmacológica	Droga	Concentração de droga no plasma (Cp)		Valores de inibição de ABCG2 (% ± DP)	
		mg/mL	µM	Cp	10 x Cp
Inibidor alfa-adrenérgico	Prasozina	0,0001	0,00007	-4,5 ± 8,6	1,3 ± 2,5
	Losartana	0,003	0,000142	-20 ± 1,5	-11 ± 2,7
antiarrítmico	Amiodarona	0,0025	4	-1,8 ± 0,6	1,9 ± 0,5
Antibiótico	Amoxicilina	0,0075	4,6	-3,8 ± 1,3	-1,2 ± 3,6
	Azitromicina	0,0004	5,3	5,3 ± 0,96	-8,2 ± 5,5
	Ampicilina	0,003	0,002	-10 ± 9,9	-4,7 ± 3,9
	Ceftriaxona	0,168	0,3	-1,1 ± 5	6,2 ± 3,5
	Ciprofloxacina	0,0027	8,6	-2 ± 3,9	9,8 ± 8
	Clindamicina	0,0025	0,58	-11 ± 11	-2,1 ± 4,5

	Doxiciclina	0,0026	0,1	-2,3 ± 7,4	-22 ± 3
	Enrofloxacino	0,105	0,06	-12 ± 1,7	-7,6 ± 10
	Gatifloxacino	0,0029	0,007	1,5 ± -7,1	-2 ± 4
	Isoniazida	0,0021	0,003	-23 ± -2,6	-5,8 ± 0,3
	Fosfomicina	0,026	0,005	3,9 ± 9,2	-4,3 ± 8,6
	Nitrofurantoina	0,001	0,001	-2,5 ± 1	-4,2 ± 4,9
	Tobramicina	0,004	0,008	-1,7 ± 2,1	-3,1 ± 5,3
antiemético	Metoclopramida	0,000074	0,24	-4,7 ± 5,8	-1,9 ± 3,5
	Naloxona	0,000000127	0,0003	-5,5 ± 0,5	9,9 ± 2
	Ondansetrone	0,000065	0,4	-8,5 ± 1,5	-2,7 ± 0,3
Antidepressivo	Sertralina	0,0001	0,001	-11 ± -1,5	-2,3 ± 2,8
	Trazodona	0,00065	0,002	-17 ± 9,5	-4,7 ± 6,2
Antimalárico	Artenusato	0,000029	0,08	-10 ± 13	-6,8 ± 3,2
Anticonvulsivante	Fenobarbital	0,000000043	0,001	-0,6 ± 4,8	-1,1 ± 2,9
Antineoplásico	Cabazitaxel	0,0001	0,01	-10 ± 11	-1,6 ± 2,7
	Capecitabina	0,004	0,002	1,2 ± 0,62	4,1 ± 1,7
	Clofarabine	0,1	0,33	-6,4 ± 7,8	1,2 ± 1,5
	Lenalidomida	0,0012	0,0077	-0,5 ± 1,8	-6,4 ± 4,8
	Mitotano	20	50	* 31 ± 8	*113 ± 3
	Temozolomide	0,017	0,0017	-2,4 ± 8,3	-0,4 ± 5,2
Antiprotozoário	Metronidazol	0,013	1,5	-4,8 ± 1,9	-3,5 ± 0,7
Antiretroviral	Dolutegravir	0,004	2	-10 ± 0,5	-9,2 ± 0,8
Antiespasmódica	Escopolamina	0,000000087	0,0003	-6,5 ± 0,2	-9,2 ± 2,6
Antiviral	Ganciclovir	0,0035	0,002	-1,19 ± 1,5	0 ± 1
Bloqueador dos canais de cálcio	Anlodipino	0,00004	0,00001	-4,3 ± 1,2	-1,9 ± 6,4
Corticosteroide	Metilprednisolona	0,0004	1,2	-7,3 ± 2,4	-7,3 ± 2,4
Antagonista da histamina	Cimetidina	0,000018	0,0002	-1,7 ± 4,1	0,6 ± 4,9
Diurético de alça	Furosemida	0,4	1	-5,9 ± 7,5	-7,4 ± 12

Neuroleptico	Clorpromazina	0,15	0,00094	-9,6 ± 3,14	0,81 ± 0,93
	Haloperidol	0,000017	0,05	4,1 ± -13	-8,4 ± 14
	Quetiapina	0,0001	0,001	3 ± 2,2	4,4 ± -3,5
	Risperidona	0,0004	0,02	2,2 ± 0,8	1 ± 4
Antagonista opioide	Naloxona	0,0000001	0,0003	-2,5 ± 6	7,9 ± 1,2
Inibidor da bomba de prótons	Omeprazol	0,0012	0,71	-2,2 ± 0,3	-7,7 ± 11
Beta-2 agonista seletivo	Fenoterol	0,0000002	0,0005	0,24 ± -8,4	2,5 ± 1,4
	Terbutalina	0,0000006	0,0003	-7,4 ± 2,5	-8,1 ± 1,7

LEGENDA: Tabela de medicamentos testados e porcentagens de inibições do efluxo mediado por ABCG2. O *screening* foi realizado utilizando células da linhagem HEK293-ABCG2 acompanhado por técnica de citometria de fluxo com filtro UV 450-50. O teste realizado utilizou substrato fluorescente Hoechst33342 (3 µM) e inibidor de referência Ko143 (1 µM). Os medicamentos foram testados na concentração plasmática (Cp), e em uma concentração 10 vezes maior como indicado (10 x Cp). Os dados referentes as concentrações plasmáticas foram padronizadas para a unidade de (µM). Os resultados estão expressos em percentual de inibição relativo ao controle positivo (100% de inibição) e foram obtidos utilizando a fórmula colocada no item 3.7 de Materiais e Métodos. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. *estatisticamente significativo p<0,05 FONTE: O autor 2023.

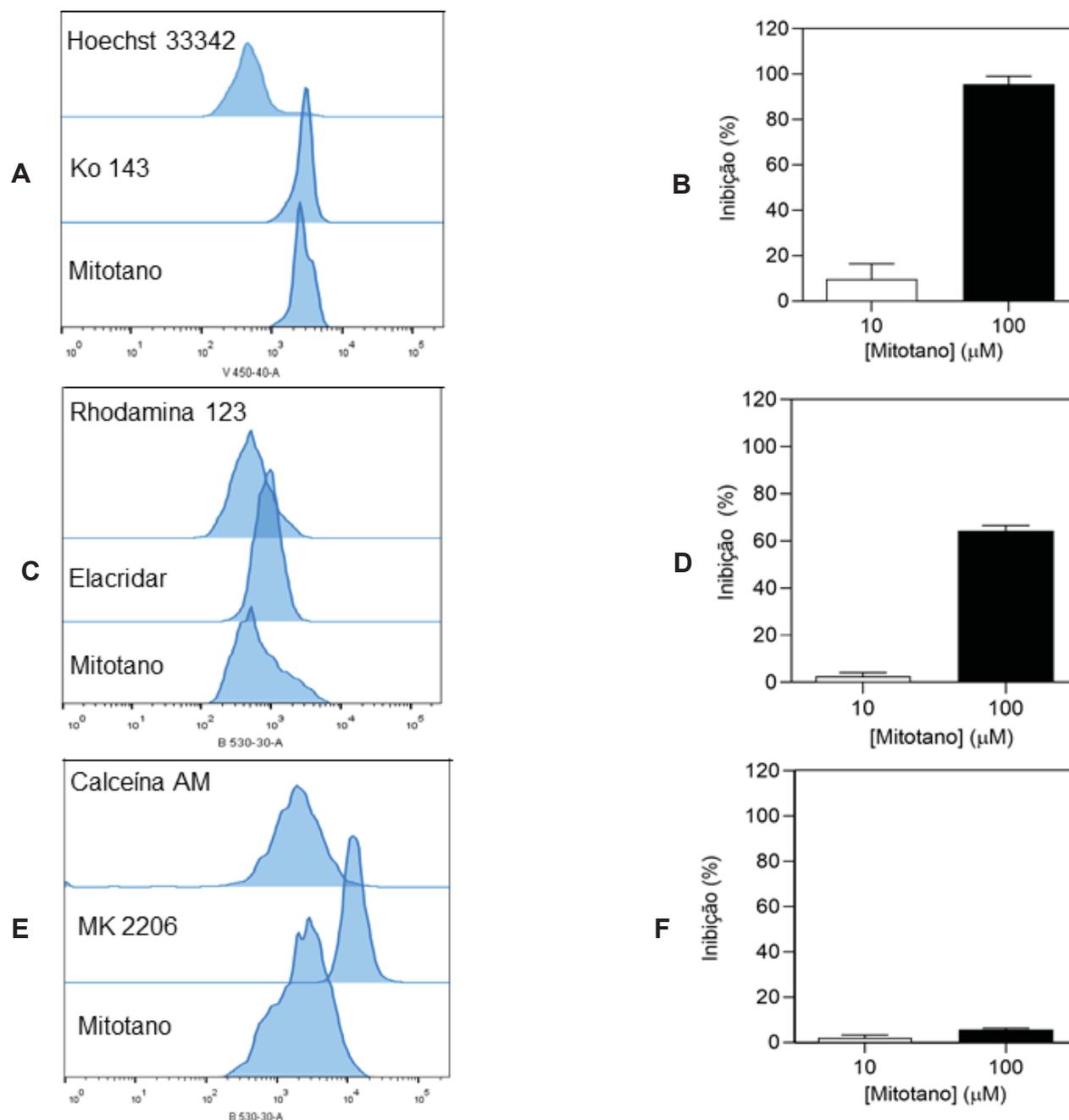
Os medicamentos foram testados como inibidores de ABCG2 a partir de sua forma farmacêutica comercial. Um dos critérios de escolha destes medicamentos para estudo foi o fato de serem medicações injetáveis ou comprimidos que apresentassem o menor número de excipientes possível. Dentre os 45 medicamentos testados, apenas o mitotano foi capaz de inibir o transportador ABCG2 (tabela 1). A concentração plasmática (Cp) do mitotano é de 20 mg/mL, que corresponde a 50 µM. Nesta concentração, o antineoplásico mitotano promoveu uma inibição parcial da atividade de ABCG2, mais precisamente de 31% relativo ao inibidor de referência Ko143. Entretanto, em uma concentração 10 vezes superior, o mitotano foi capaz de inibir completamente o transportador ABCG2 (tabela 1). A partir desses resultados, o mitotano, em sólido e com elevado grau de pureza foi adquirido da empresa Merck e utilizado nos demais ensaios.

O mesmo ensaio de inibição foi novamente realizado, agora utilizando o mitotano puro e diluído em DMSO. Neste ensaio foram testadas as concentrações de 10 e 100 µM. Ainda, além de células transfectadas para superexpressar ABCG2, também foram utilizadas células transfectadas para superexpressar os transportadores P-gp (NIH3T3-ABCB1) e MRP1 (BHK21-ABCC1). Na figura 7 estão

apresentados os resultados obtidos dos testes de inibição empregando o mitotano frente as três proteínas: ABCG2, P-gp e MRP1. Neste experimento foram utilizados os seguintes substratos fluorescentes: h ochst 33342, rodamina 123 e calce na-AM, para ABCG2, P-gp e MRP1, respectivamente. Estes substratos s o transportados para fora da c lula pelos transportadores citados, permitindo assim que seu ac mulo intracelular seja quantificado por citometria de fluxo. Como controle positivo de inibi o (100% de inibi o) foram utilizados os seguintes inibidores de refer ncia: Ko143 para ABCG2, Elacridar para P-gp e MK571 para MRP1.

Os histogramas de inibi o obtidos por citometria de fluxo (Fig. 6A) e o gr fico 6B indicam que o mitotando   capaz de inibir cerca de 25% e 100 % o transporte mediado pelo transportador ABCG2 nas doses de 10 e 100 μM respectivamente. Contudo, de maneira interessante, com a concentra o de 10 μM de mitotano n o foi poss vel verificar inibi o estatisticamente significativa de P-gp, mas, na maior concentra o testada (100 μM) foi poss vel observar uma inibi o parcial (~60%) do transporte realizado por P-gp (Fig. 6C e D). Ainda na figura 6 pode-se verificar que mesmo na maior concentra o testada, o mitotano n o foi capaz de inibir o transportador MRP1 (Fig. 6E e F). Esses resultados sugerem que o mitotano   um inibidor duplo, ou seja, inibe tanto ABCG2 quanto P-gp.

FIGURA 6 – Efeito do mitotano no transporte de substrato mediado pelos transportadores ABC utilizando células HEK293-*ABCG2*, NIH3T3-*ABCB1* e BHK21-*ABCC1*



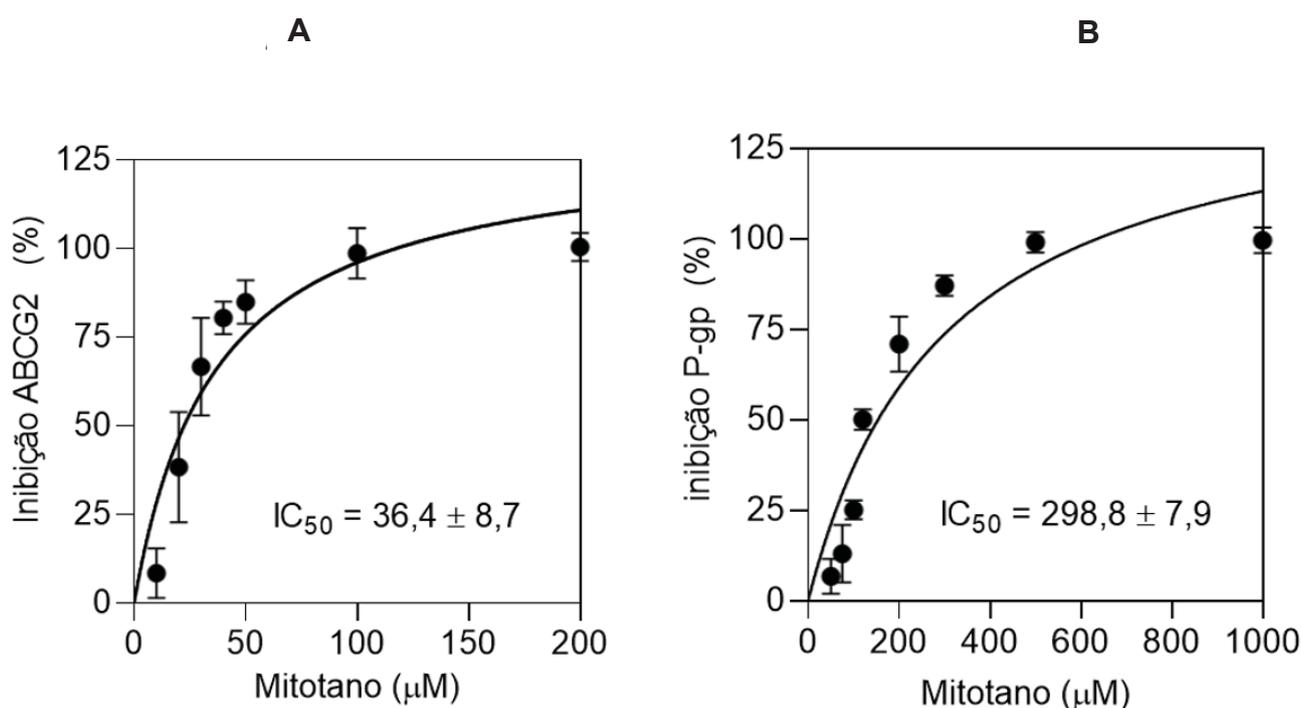
LENGENDA: Inibição de atividade de transporte das proteínas ABCG2, PgP e ABCC1. Os experimentos foram realizados utilizando as linhagens HEK-293 *ABCG2*, NIH-3T3 *P-gp* e BHK-21 *MRP* como indicado no item 3.5 de *Materiais e Métodos*. (A) Histograma representativo com *overlays* de fluorescência do substrato hœchst-33342 (3 μM) o inibidor de referência Ko143 (1 μM) e mitotano como indicado. (B) Percentual de inibição referente aos dados da figura A. (C) Histograma representativo com *overlays* de fluorescência do substrato rhodamina 123 (5 μM) o inibidor de referência elacridar (1 μM) e mitotano como indicado. (D) Percentual de inibição referente aos dados da figura C. (E) Histograma representativo com *overlays* de fluorescência do substrato calceína-AM (0,15 μM) o inibidor de referência MK-571 (1 μM) e mitotano. (F) Percentual de inibição referente aos dados da figura E. Os resultados representam média ± desvio padrão de 2 ou 3 experimentos realizados em triplicatas independentes. Diferença estatisticamente significante entre as diferentes concentrações p<0,001 (****) FONTE: O autor 2023.

Após confirmar o mitotano como inibidor de ABCG2 e identificá-lo como inibidor parcial da P-gp, foram testadas diferentes concentrações do mitotano para obter valores de IC₅₀ de inibição (concentração de mitotano capaz de inibir em 50% da atividade de transporte mediada pelo transportador alvo).

4.2 IC₅₀ de inibição do mitotano em ABCG2 e P-gp

As figuras 7A e 7B representam as curvas de inibição do mitotano no transporte mediado por ABCG2 e P-gp, respectivamente. O valor de IC₅₀ de inibição em ABCG2 foi de 36,4 µM, enquanto que para P-gp o valor de IC₅₀ foi de 298,8 µM (Fig. 7A e B).

FIGURA 7 – Curva de Inibição promovida pelo mitotano frente aos transportadores ABCG2 e P-gp



LEGENDA: Determinação da concentração de mitotano capaz de gerar inibição de 50% (IC₅₀) da atividade das proteínas ABCG2 e ABCB1 (P-gp). Ensaio realizado com as linhagens HEK293-ABCG2 e NIH3T3-ABCB1 conforme indicado no item 3.3 de Material e Métodos. Os ensaios foram realizados através da técnica de citometria de fluxo. Foram utilizados como substrato para ABCG2 hœchst-33342 (3µM) e inibidor de referência Ko143 (1 µM), para P-gp rodamina 123 (5 µM) e inibidor de referência elacridar (1 µM). Células HEK293-ABCG2 e NIH3T3-ABCB1 foram expostas a concentrações crescentes de mitotano (A) (10 – 200 µM e (B) 50 µM – 1 mM como indicado. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata e os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. FONTE: O autor 2023.

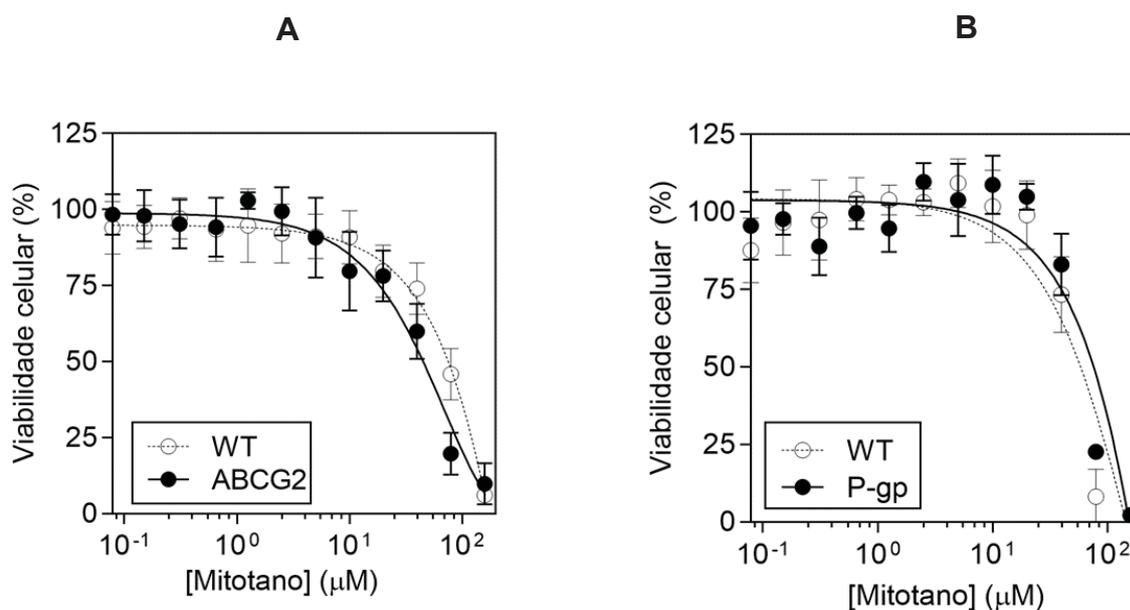
Após a obtenção dos valores de IC_{50} , foi realizado o ensaio de viabilidade celular para avaliar um possível transporte do mitotano mediado por ABCG2 ou P-gp e também determinar a citotoxicidade do composto em diferentes concentrações.

4.3 Ensaio de transporte de mitotano mediado por ABCG2 e P-gp

Para identificar se o mitotano é também um substrato destas proteínas, foram utilizadas as células parentais (HEK293 e NIH3T3) e as transfectadas de maneira estável para superexpressar ABCG2 (HEK293-ABCG2) e P-gp (NIH3T3-*ABCB1*). Após 72 horas de tratamento com mitotano, a viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT. A figura 8A mostra os resultados obtidos para o transportador ABCG2. Foi possível observar que o perfil de redução de viabilidade celular foi semelhante nas duas linhagens, HEK293 e HEK293-ABCG2. Os resultados obtidos sugerem que o mitotano não é transportado por ABCG2, uma vez que a citotoxicidade do medicamento foi a mesma em ambas linhagens celulares.

A figura 8B apresenta o resultado obtido em células NIH3T3 e NIH3T3-*ABCB1*. Como pode ser observado, o resultado assemelha-se ao encontrado na figura 8A, logo, é também possível inferir que o mitotano não é substrato do transportador P-gp.

FIGURA 8 - Ensaio de viabilidade celular para avaliar citotoxicidade e transporte de mitotano mediado por ABCG2 e P-gp



LEGENDA: Ensaio de viabilidade celular para as linhagens HEK293 *wild type* e HEK293-*ABCG2* (A) NIH3T3 *wild type*, e NIH3T3-*ABCB1* para verificar se o mitotano é substrato das proteínas ABCG2 e P-gp (B). Os ensaios foram realizados segundo a técnica de MTT empregando concentrações crescentes de mitotano (0,078 μM a 160 μM) para ambas proteínas como indicado no item 3.4 de Material e Métodos. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata e os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. FONTE: O autor 2023.

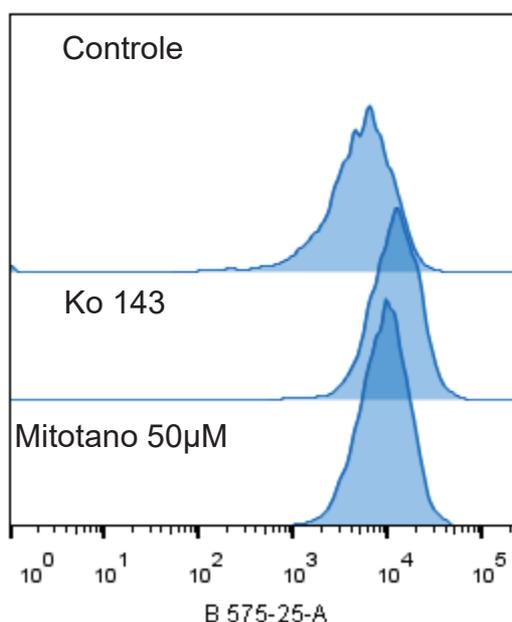
Considerando que o mitotano interage com ABCG2 e P-gp, o próximo experimento foi realizado utilizando anticorpos que reconhecem e se ligam a um loop extracelular dos transportadores ABCG2 e P-gp. Esses anticorpos são chamados de anticorpos conformacionais, pois podem sugerir que a interação de ligantes induz alterações alostéricas na estrutura da proteína através da verificação de alterações em suas taxas de reconhecimento e ligação à proteína alvo (ZATTONI *et al.*, 2022).

4.4 Efeito da ligação do mitotano monitorada pelo uso de anticorpos conformacionais

Neste experimento foi avaliado se a ligação de anticorpos que reconhecem as regiões extracelulares de ABCG2 e P-gp é afetada pela presença de mitotano. Como pode ser observado na figura 9, tanto o mitotano quanto o inibidor de referência de ABCG2, o Ko143, aumentaram o reconhecimento do epítipo de ABCG2 reconhecido pelo anticorpo conformacional (TELBISZ *et al.*, 2012). Entretanto, o mesmo efeito não foi observado para P-gp, uma vez que apenas o inibidor de

referência, Elacridar, aumentou o reconhecimento do anticorpo conformacional (Fig. 9). Os deslocamentos dos histogramas demonstram a maior exposição do sítio 5D3 e maior ligação do anticorpo ao sítio, a maior exposição pode ser encontrada com o inibidor de referência Ko143 quanto com mitotano.

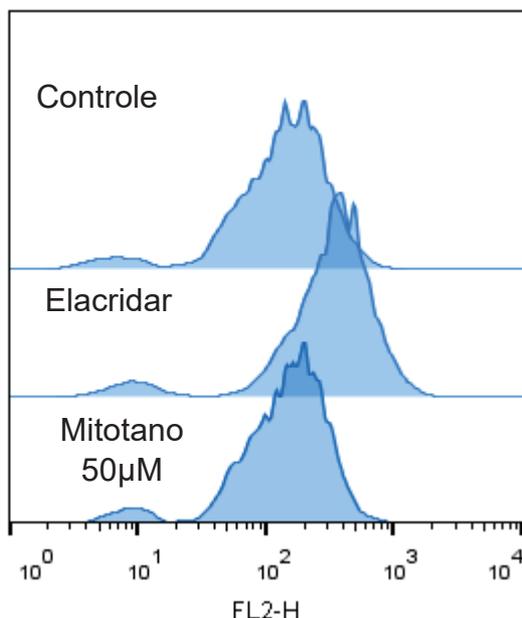
FIGURA 9 - Alteração da exposição do sítio 5D3 em HEK293-ABCG2 tratada com mitotano (50 μ M)



LEGENDA: Os histogramas representativos de fluorescência que indicam alteração na exposição do sítio 5D3, região extracelular da proteína ABCG2. Os experimentos foram realizados utilizando a linhagem HEK-293 ABCG2. Os experimentos foram realizados com a incubação do inibidor de referência Ko143 (1 μ M) e mitotano (50 μ M), e posterior adição dos anticorpos primário e secundário. Os experimentos foram realizados através da técnica de citometria de fluxo em duas replicatas independentes. FONTE: O autor 2023.

Ainda, o mesmo tipo de ensaio fora realizado desta vez frente a proteína P-gp, (Fig. 10) neste caso não foi possível notar qualquer alteração da exposição do epítipo de ABCB1 com mitotano a 50 μ M. Os deslocamentos dos histogramas demonstram a maior exposição do sítio 17F9 e maior ligação do anticorpo ao sítio a maior exposição pode ser encontrada com o inibidor de referência Elacridar (1 μ M).

FIGURA 10 - Ensaio de anticorpo conformacional 17F9 em NIH3T3-*ABCB1*



LEGENDA: Os histogramas representativos de fluorescência que indica a alteração na exposição do sítio 17F9, região extracelular da proteína P-gp. Os experimentos foram realizados utilizando a linhagem NIH3T3-*ABCB1*. Os experimentos foram realizados com a incubação do inibidor de referência Elacridar (1 μM) e do mitotano (50 μM), e posterior adição dos anticorpos primário e secundário. Os experimentos foram realizados através da técnica de citometria de fluxo em duas replicatas independentes. FONTE: O autor 2023.

4.5 Docking molecular

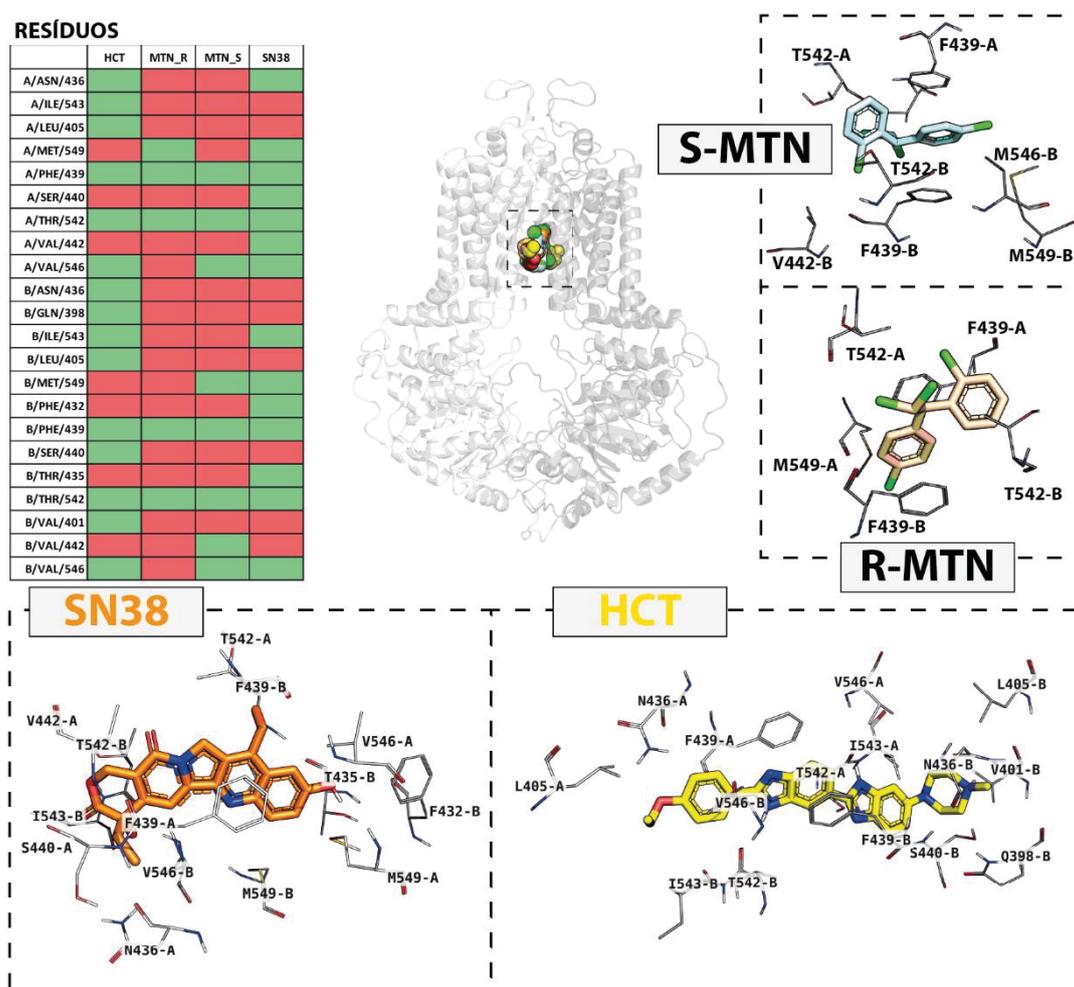
Os resultados obtidos em experimentos *in vitro*, baseado no uso de células, revelaram que o mitotano interage com ABCG2 e P-gp, atuando como inibidores não transportados. Para avaliar o sítio de ligação e resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação de mitotano em ABCG2 e P-gp, uma análise computacional *in silico* de docking molecular foi realizada.

Para o transportador ABCG2 foi utilizada a estrutura resolvida por Crio-EM PDB: 6VXI. Os resultados obtidos pelo docking molecular (Fig. 11) indicaram uma sobreposição do sítio de ligação do mitotano com o sítio de ligação de outros inibidores e substratos de ABCG2 (DI MICCO *et al.*, 2023). Uma vez que o mitotano utilizado nos experimentos é uma mistura racêmica, os enantiômeros R e S do mitotano foram avaliados separadamente nesta análise *in silico*. Ambos enantiômeros apresentaram interações similares ao longo das poses, possuindo pouca variação de energia de ligação (pose 1 = -7.381 e -7.261 kcal/mol para R e S, respectivamente), indicando que provavelmente não há preferência enantiomérica para ligação desse

inibidor em ABCG2.

Como pode ser observado na figura 4, a estrutura química do mitotano não apresenta hidroxilas e grupamentos amino disponíveis para realização de pontes de hidrogênio. Contudo, essa ausência é compensada pela presença dos átomos de cloro. Esses átomos de cloro demonstraram capacidade de manter pontes de halogênio com os resíduos de aminoácido ASN436, THR542, ILE543 e PHE439 (Fig. 11). Além disso, diferentemente do enantiômero R do mitotano, o S-mitotano parece interagir com o resíduo de aminoácido VAL442 (Fig. 11).

FIGURA 11 – Docking molecular em ABCG2



LEGENDA: Canto superior esquerdo: Representação em tabela dos resíduos em proximidade (<math><4\text{\AA}</math>) de cada molécula na pose 1, sendo a presença indicada pela cor verde e ausência por vermelho; Centro: Estrutura 6VXI com os quatro compostos ligados na cavidade central; Demais quadrados: Representação em 3D das quatro moléculas e aminoácidos próximos (4Å). S-MTN = S-mitotano; R-MTN = R-mitotano; HCT = Hoechst 33342. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e cloro em verde, átomos de carbono coloridos de acordo com cada composto (SN38 = laranja, HCT = amarelo, R-MTN = bege; S-MTN = azul-claro).
 FONTE: O autor 2023

Além do mitotano, os substratos Hoechst 33342 e SN38 (metabolito ativo do irinotecano), que foram utilizados nos experimentos *in vitro* deste trabalho, também fora avaliado *in silico*. Tanto o mitotano quanto esses dois substratos interagiram com os resíduos de aminoácidos ASN436, ILE543, THR542 e PHE439, evidenciando uma sobreposição de sítio de ligação de inibidores e substratos, comumente observada em ABCG2. Todas as moléculas apresentaram interações hidrofóbicas entre suas porções aromáticas e o resíduo de aminoácido PHE439, intimamente relacionado ao processo de estabilização de compostos dentro da cavidade central da proteína por empilhamento-Pi (Tabela 2) (GOSE *et al.*, 2020). Ainda, o resíduo de aminoácido VAL546 interagiu com ambos os substratos e o enântiômero S do mitotano, porém, não foi observada interação com o R-mitotano (Fig. 11).

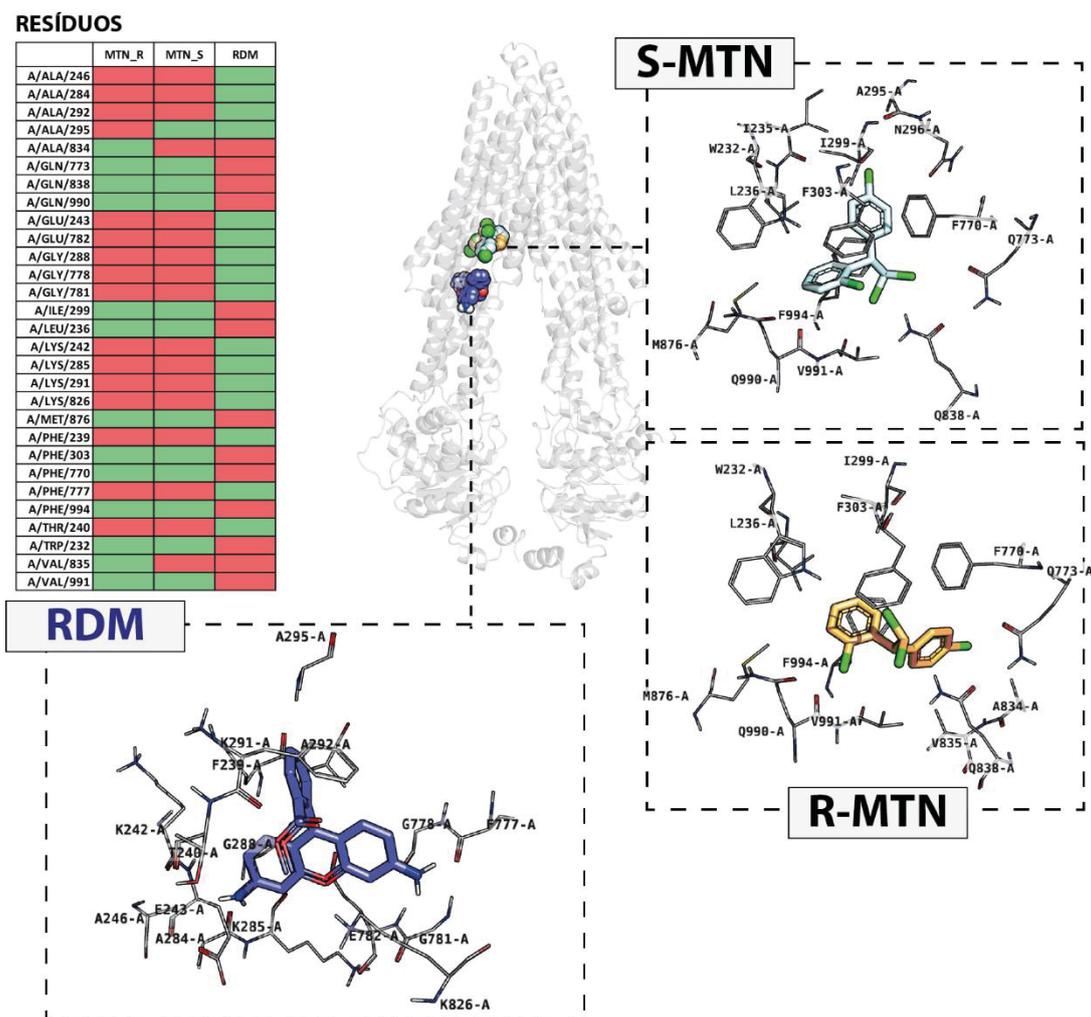
TABELA 2 - Resíduos de aminoácidos que realizam interação com ABCG2 em diferentes poses

RESÍDUO	MTN_R										MTN_S										SN38										HCT																																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10																										
ASN436-A				Verde																																																														
ASN436-B																																																																		
GLN398-A																																																																		
GLN398-B																																																																		
GLU446-A																																																																		
PHE439-A	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde		Verde				Verde	Verde	Verde	Verde	Verde			Verde					Verde																																											
PHE439-B	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde		Verde				Verde	Verde	Verde	Verde	Verde			Verde					Verde																																											
THR542-A																																																																		
THR542-B																																																																		

Legenda: MTN_R: Isômero R do mitotano; MTN_S: Isômero S do mitotano; SN38: metabolito ativo do irinotecano; HCT: Hoechst33342. Numerações de 1 a 10 representam cada uma das poses analisadas. Verde = Empilhamento-pi, Azul = Ponte de halogênio, Vermelho = Pi cátion Amarelo = Ponte de hidrogênio. Fonte: O autor 2023.

Considerando a interação do mitotano com ambos os transportadores ABCG2 e P-gp, também foi realizada uma análise de docking molecular utilizando a estrutura da P-gp PDB:6QEX. Diferentemente de ABCG2, no qual houve sobreposição de sítios de ligação (Fig. 11), para a P-gp o substrato utilizado nas análises, que foi a rodamina 123, apresentou um sítio de ligação em uma região diferente do mitotano (Fig. 12).

FIGURA 12 – Docking molecular em em P-gp



LEGENDA: Canto superior esquerdo: Representação em tabela dos resíduos em proximidade (<math><4\text{\AA}</math>) de cada molécula na pose 1, sendo a presença indicada pela cor verde e ausência por vermelho; Centro: Estrutura 6QEX com os três compostos ligados na proteína; Demais quadrados: Representação em 3D das três moléculas e aminoácidos próximos (4Å). S-MTN = S-mitotano; R-MTN = R-mitotano; RDM = Rodamina 123. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e cloro em verde, átomos de carbono coloridos de acordo com cada composto (RDM = azul escuro, R-MTN = bege; S-MTN = azul-claro). FONTE: O autor 2023.

Diferente do observado em ABCG2, em P-gp, houve apenas um aminoácido em comum em interação entre Rhodamina 123 e a forma S do mitotano, este ALA295, ademais, nenhum aminoácido em comum com a forma R. A maioria dos aminoácidos realizaram interações em comum entre os enantiômeros R ou S do mitotano são eles: GLN773, GLN 838, 990, ILE299, LEU236, MET 876, PHE 303, PHE 770, PHE994, TRP232 e VAL991. Dentre os aminoácidos que realizaram interações somente com uma das formas do mitotano, encontram-se: ALA295, somente com a forma S, ALA834, somente com a forma R e VAL835 também apenas com a forma R (Fig. 12).

Algumas interações entre P-gp e os isômeros R e S de mitotano bem como Rhodamina 123 são demonstrados na Tabela 3.

TABELA 3. Resíduos de aminoácidos que realizam interação com P-gp em diferentes poses

RESÍDUO	MTN_R										MTN_S										RDM									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ARG148							Vermelho																							
ARG789																														
ASN296																														
GLN347																														
GLN838																														
GLN990																														
GLU243																														
GLY774																														
LYS242																														
LYS291																														
LYS826																														
PHE239																														
PHE343																														
PHE770																														
PHE983																														
PHE994																														
SER831																														
TRP232																														

Legenda: MTN_R: Isômero R do mitotano; MTN_S: Isômero S do mitotano; RDM: Rhodamina 1234. Numerações de 1 a 10 representam cada uma das poses analisadas. Verde = Empilhamento-pi, Azul = Ponte de halogênio, Vermelho = Pi cátion Amarelo = Ponte de hidrogênio. Fonte: O autor 2023.

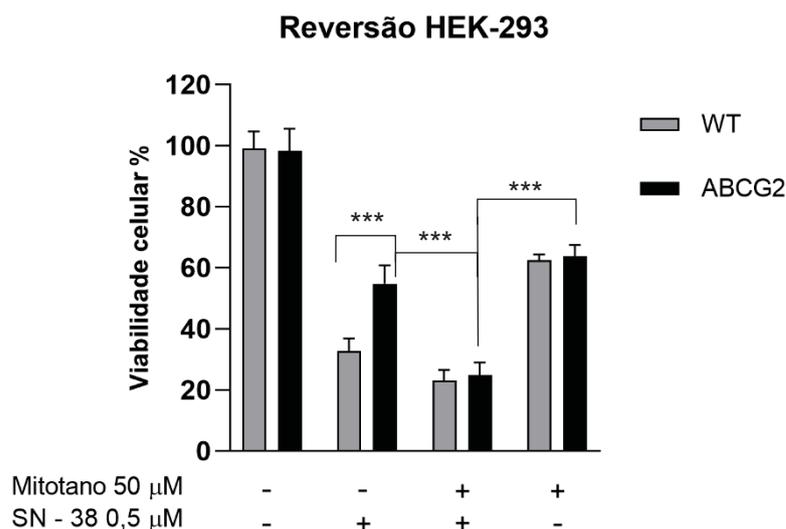
Os resíduos aminoácidos PHE770 e PHE994 fazem empilhamentos-Pi com os anéis aromáticos do mitotano (Fig. 13), de maneira análoga ao observado com o resíduo de aminoácido PHE439 em ABCG2 (Fig. 11). A extensão e variedade das pontes de halogênio foi maior na P-gp, realizando-se entre os átomos de cloro e as cadeias laterais de Gln838 e 347, Gly774, Asn296, Glu243, Lys242 e Arg148 (Tab. 2). Uma vez que a cavidade interna da P-gp é maior e menos hidrofóbica que a de ABCG2, é possível que ligações de halogênio possuam mais influência no processo de estabilização do inibidor do que observado em ABCG2.

A interação da rodamina 123 em P-gp foi estabilizada por interações Van der Waals e Pi-cátion entre os anéis aromáticos da rodamina 123 e o resíduo de Lys826 (Tab. 3).

4.6 Reversão da resistência mediada por ABCG2 através do uso de mitotano

Após identificação do mitotano como inibidor funcional do transportador ABCG2 em concentrações similares as de uso clínico, se fez necessário avaliar se a associação do uso de mitotano com um quimioterápico substrato de ABCG2 reverteria o fenótipo de resistência. Como pode ser observado na figura 13, o tratamento de células HEK293 e HEK293-ABCG2 com o quimioterápico SN38 promoveu uma redução da viabilidade celular de cerca de ~70% para célula *Wild Type* e de cerca de ~45% para células que superexpressam ABCG2. Este fato pode ser explicado, pois o SN38 é transportado por ABCG2 levando a uma redução da viabilidade celular mais pronunciada em células HEK293 *Wild Type*, quando comparada com HEK293-ABCG2 na mesma condição experimental. Contudo, o tratamento destas duas linhagens com o mitotano também reduziu a viabilidade celular, mas neste caso, de maneira semelhante em ambas as linhagens (~40%). Este resultado já era esperado pois o mitotano não é reconhecido como um substrato de ABCG2 (Fig. 13). Por fim, a associação do mitotano com o SN38 reverteu completamente a resistência mediada pelo transportador ABCG2, uma vez que foi observado o mesmo efeito citotóxico (~75% de redução de viabilidade) em ambas as linhagens: HEK293 *Wild Type* e HEK293-ABCG2.

FIGURA 13 - Ensaio de reversão na linhagem HEK-293 ABCG2 e HEK-293 *Wild Type*



LEGENDA: Análise de reversão do fenótipo de resistência promovido pelo mitotano em células HEK-293 na presença ou ausência de SN-38. O experimento foi realizado com a utilização da técnica de MTT com as linhagens HEK-293 *Wild Type* e HEK-293 ABCG2 como indicado no item 3.4 em Material e Métodos. As barras representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicatas. Estatisticamente significativo $p < 0,001$ ***. FONTE: O autor 2023.

5 DISCUSSÃO

Dentre as diferentes estratégias para reverter a MDR mediada por transportadores ABC, o uso de inibidores parece ser a mais promissora (BOUMENDJEL *et al.*, 2011; ZATTONI *et al.*, 2022). Por ter sido descoberta em 1976, a P-gp, que foi de fato a primeira proteína que demonstrou associação com MDR, possui o maior número de inibidores já descritos. Além disso, desde 2001 o uso de inibidores da P-gp chegou em fase clínica. Ao longo do tempo foram desenvolvidos inibidores mais potentes e seletivos da P-gp, que atualmente está na terceira geração (CANTORE *et al.*, 2016). Diferentemente da P-gp, ainda não foi realizado nenhum teste clínico com inibidores de ABCG2 (ZATTONI *et al.*, 2022). Entretanto, o transportador ABCG2 é considerado o segundo transportador ABC mais importante no contexto de MDR em câncer, o que torna urgente o desenvolvimento de um potente inibidor para ser testado em fase clínica (ROBEY *et al.*, 2018).

Das inúmeras estratégias para o desenvolvimento de inibidores, o reposicionamento de fármacos tem se mostrado promissor, uma vez que é uma estratégia que envolve o uso de medicamentos de uso clínico aprovado (HEE *et al.*, 2014). Essa estratégia é promissora pois envolve um menor custo de desenvolvimento, quando comparado às estratégias que iniciam com a síntese de novos compostos. Além disso, o tempo de desenvolvimento é reduzido significativamente, uma vez que já são conhecidas as doses clínicas e possíveis efeitos colaterais ou adversos (TALEVI *et al.*, 2020). Dentre alguns exemplos bem sucedidos desta estratégia pode-se citar: (i) Sildenafil, que foi aprovado para o tratamento da disfunção erétil e é usado atualmente para o tratamento de hipertensão pulmonar (ASHBURN *et al.*, 2004); (ii) Metformina: que foi aprovado para o tratamento do diabetes tipo 2 e atualmente é estudado como um forte candidato para o tratamento de alguns tipos de câncer, levando a aumentos de AMP e ativação de AMPK, que inibe mTOR e a proliferação celular (ZHOU *et al.*, 2001); (iii) Talidomida, que inicialmente foi um medicamento desenvolvido com a finalidade de uso como sedativo, entretanto, acidentalmente anos depois foi descoberta a capacidade de tratar mieloma múltiplo (SINGHAL *et al.*, 1999).

Dentro do contexto de reposicionamento de fármacos como inibidores de transportadores ABC, podemos citar o que talvez seja o inibidor de ABCG2 mais promissor para seguir em testes clínicos, o Febuxostat[®] (ZATTONI *et al.*, 2022).

Dentre as características que chamam atenção, vem o fato de que a medicação tem uso clínico a uma concentração plasmática de 90 nM, e seu IC₅₀ como inibidor de ABCG2 encontra-se na faixa de 27 nM. Além disso, estudos *in vivo* demonstraram a capacidade desta medicação de inibir a proteína ABCG2 intestinal em camundongos quando administrada por via oral, aumentando a concentração sérica de um substrato, a sulfasalazina, (MIYATA *et al.*, 2016).

Dentre os medicamentos testados neste trabalho (tabela 1) o mitotano foi o único capaz de inibir a atividade do transportador ABCG2. Interessantemente, o mitotano apresentou um valor IC₅₀ de inibição de 36,8 µM (Fig. 7A), um valor próximo da dose de uso na clínica, que é de aproximadamente 50 µM (CUNHA, 2022). Apesar do mitotano também inibir a P-gp (Fig. 6D), o valor de IC₅₀ de inibição foi de 298,8 µM (Fig. 7B). Esse valor é 6 vezes superior a concentração plasmática, impossibilitando vislumbrar um futuro uso clínico do mitotano como inibidor da P-gp. Entretanto, torna-se importante destacar que esse é o primeiro trabalho que demonstra que o mitotano interage e inibe ABCG2. Além disso, é importante salientar que foi observado o fato de que o mitotano não é reconhecido como substrato para as proteínas estudadas (Fig. 8).

Ao contrário, para P-gp alguns estudos anteriores demonstram que o mitotano é capaz de inibir a proteína. Entre os trabalhos descritos na literatura que verificaram a atividade de mitotano frente ao transportador P-gp podemos citar o de Gagliano e colaboradores (2014). Estes autores utilizaram a linhagem H295 sem expressão de P-gp e SW13 com expressão de P-gp, também utilizaram de uma metodologia diferente da utilizada em nosso trabalho, que envolveu incubação de mitotano e um substrato, no caso, doxorrubicina por 120 h e posterior análise de morte celular por MTT. Os autores incubaram as células sem expressão e que superexpressavam a P-gp com diferentes concentrações de mitotano e verificaram que na concentração de 30 µM de mitotano o perfil de morte da linhagem com superexpressão se tornava semelhante ao da linhagem sem expressão da proteína. Em nosso trabalho, utilizamos as células NIH3T3-*ABCB1*, que foram incubadas com diferentes concentrações de mitotano por 30~40 minutos e os resultados foram obtidos por citometria de fluxo. Bates e colaboradores (1991), utilizaram a linhagem SW620 de câncer colorretal parental com baixa expressão de P-gp, e a linhagem DLD-1 com alta expressão de P-gp. A partir de análise realizada por cintilação, técnica esta, também diferente da utilizada neste trabalho, utilizando actinomicina-D^(H)

e a vimblastina^(H) marcados, sua quantificação foi realizada no meio sobrenadante. Os resultados deste estudo apontaram que a concentração de 15 µg/mL de mitotano utilizada conseguiu gerar um acúmulo de vimblastina semelhante nas linhagens SW620 (com baixa expressão de P-gp) e DLD-1 (com alta expressão de P-gp) (GAGLIANO *et al.*, 2014; BATES *et al.*, 1991).

Um dos desafios na MDR mediada por transportadores ABC é sobreposição de quimioterápicos carregados por diferentes transportadores ABC e a grande quantidade de quimioterápicos sem nenhuma correlação estrutural que são transportados principalmente pela P-gp e ABCG2 (ROBEY *et al.*, 2011). Considerando que o mitotano é um medicamento já em uso no tratamento do câncer, também foi investigado se o mitotano poderia ser transportado, uma vez que existem inúmeros exemplos de inibidores de transportadores ABC que são também reconhecidos como substratos (ZATTONI *et al.*, 2022). Os resultados sugerem que o mitotano não é transportado por ABCG2 e P-gp, uma vez que o perfil citotóxico foi o mesmo em células parentais e em células que superexpressam cada um desses transportadores ABC (Fig. 8A-B).

Outro aspecto investigado neste trabalho foi a alteração de epítomos extracelulares das proteínas ABCG2 e P-gp. Esta alteração pode ocorrer devido a ligação de inibidores com a porção TMD dos transportadores (ZATTONI *et al.* 2022). Para ABCG2 por exemplo já foi relatado na literatura que a interação do seu inibidor de referência Ko143 levou a alterações conformacionais que expuseram mais o epítopo reconhecido pelo anticorpo 5D3 (OZVEGY-LACZKA *et al.*, 2005). Enquanto que para a proteína P-gp o anticorpo utilizado é o 17F9, cuja ligação em P-gp também é afetada pela utilização de inibidores. Kita e colaboradores (2022), demonstraram que tanto o inibidor de referência, elacridar, quanto inibidores testados pelo trabalho, polioxivanadatos, alteraram a exposição do sítio extracelular reconhecido pelo anticorpo 17F9. Neste trabalho observou-se que a concentração utilizada de mitotano, 50 µM, alterou a exposição do epítopo reconhecido por 5D3 (Fig. 9), entretanto, o mesmo não pode ser observado para P-gp (Fig. 10).

Para ABCG2 os resultados indicam que, o mitotano se comporta como outros inibidores já relatados na literatura, que são capazes de alterar a exposição do sítio. Este sítio extracelular é reconhecido pela sua capacidade de ser mais ou menos exposto quando ligado ou não a inibidores. Interessantemente, a ligação com este sítio também esta associada a inibição da atividade da proteína, uma vez que há o

bloqueio da formação da conformação *outward-facing* importante durante o processo de efluxo de substratos (ZATTONI *et al.*, 2022). Diferente de ABCG2, em P-gp, não houve alteração de exposição do epítipo quando comparado ao inibidor de referência utilizado, elacridar. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos nos testes de inibição do transporte uma vez que na concentração testada para P-gp, o mitotano não apresentava inibição estatisticamente significativa (Fig. 6D).

Os resultados de docking molecular demonstraram que, para P-gp, os sítios de ligação de mitotano, Phe770 e Phe 994 responsáveis pela interação com as porções dos anéis aromáticos do mitotano, e as pontes com halogênio, entre os átomos de cloro e as cadeias laterais de Gln838 e 347, Gly774, Asn296, Glu243, Lys242 e Arg148 (figura 14), são sítios diferentes dos sítios de ligação do substrato a proteína, neste caso delimitada por aminoácidos como Val835 e Glu782 (CHUFAN; SIM; AMBUDKAR, 2015). A não sobreposição dos sítios de ligação entre o mitotano e a rodamina 123 sugere uma ausência de competição. Este resultado corrobora com o resultado encontrado no ensaio de transporte. Contudo, para fazer tal afirmação, mais ensaios são necessários para avaliar o tipo de inibição conferida pelo mitotano em P-gp, através de ensaios de dinâmica molecular e estudos *in vitro* como de tipo de inibição, que consiste em alterar a concentração de substrato, com dose fixa de inibidor e avaliar a cinética através de valores de $V_{m\acute{a}x}$.

A divisão de P-gp em subsítios com afinidades diferentes a certos compostos já foi previamente sugerida na literatura, especialmente para Hoechst, Rodamina B e Prazosina (CHUFAN; SIM; AMBUDKAR, 2015). Interessantemente, as cadeias laterais de Gln não se mostram indispensáveis para a atividade de transporte de moléculas na P-gp (SASITHARAN *et al.*, 2021).

A cavidade da P-gp possui dois sítios principais, relacionados com o processo de transporte de substratos, os sítios M (principal) e R (secundário). O sítio M se refere ao local principal de ligação do substrato na P-gp onde as moléculas de substrato inicialmente se ligam à P-gp. Todavia, o sítio R é um local de ligação secundário, que pode ser usado quando o sítio M está ocupado ou para acomodar múltiplos substratos. Em outras palavras, o sítio R é um local de ligação "residual" que pode ser usado como um *backup* quando o sítio M não está disponível (FERREIRA *et al.*, 2013). Os sítios M e R de P-gp são altamente flexíveis e dinâmicos, permitindo que a proteína transporte uma ampla variedade de substratos diferentes. A ligação de substrato aos sítios M e R leva a uma mudança conformacional na proteína, que

resulta no transporte de substrato para fora da célula (FERREIRA *et al.*, 2013).

Pela análise dos aminoácidos próximos, pode-se determinar que o mitotano se liga a uma região de fronteira entre o sítio-M e sítio-R, normalmente relacionado a compostos inibidores dessa proteína. O medicamento alectinib é um inibidor de tirosina quinase atualmente usado no tratamento de primeira linha do câncer de pulmão de células não pequenas (CPNPC), descrito como inibidor de P-gp e ABCG2. O alectinib possui um perfil semelhante ao efeito observado para mitotano neste trabalho (HOFMAN *et al.*, 2019).

No caso de ABCG2, tanto o mitotano quanto os substratos utilizados compartilham vários resíduos de aminoácidos, a citar: ASN436, ILE543, THR542 e PHE439 (Fig. 12). Esse resultado está de acordo com a literatura, pois foi demonstrado que inibidores de ABCG2 compartilham a mesma cavidade de ligação de substratos. No trabalho de ORLANDO e colaboradores (2020) é descrito o papel destes aminoácidos na interação com Mitoxantrona, SN-38 e Imatinib, onde inibidores e substratos foram capazes de ligar ao resíduo PHE439 em, por meio de interações aromáticas, da mesma forma que ASN436 demonstrou realizar interações hidrofílicas com inibidores e substratos. Além disso, estes resíduos de aminoácidos foram previamente caracterizados na literatura por participarem dos processos de inibição e transporte de ABCG2 com outros compostos (JACKSON *et al.*, 2018).

Para além dos resíduos de aminoácidos que realizaram interação com mitotano recentemente, análises *in silico* demonstraram a interação de inibidores de ABCG2 por meio de pontes de halogênio com os outros resíduos de aminoácidos, a citar: Met54 e Thr435 (DI MICCO *et al.*, 2023). Embora os compostos tenham ocupado majoritariamente posições sobrepostas no docking, é provável que outras regiões de ligação sejam viáveis, de modo que a inibição não ocorra por competição pelo sítio de ligação, mas sim pela interrupção do ciclo catalítico de transporte por impedimento estérico (YU *et al.*, 2021).

Adicionalmente, uma das posições de ligação obtidas para o mitotano, em ambos os isômeros, realizou ponte de halogênio com o resíduo Arg482, responsável por especificidade no transporte de alguns substratos como metotrexato, cujo transporte também não ocorre em ABCG2 R482G (ÖZVEGY-LACZKA *et al.*, 2005, p. 482).

Por fim, reafirmou-se o uso do mitotano como inibidor de ABCG2 através de um ensaio de longa duração para verificação da reversão do fenótipo de resistência

mediado pelo transportador em questão. Inibidores promissores, durante o processo de screening, também devem passar por esse tipo de análise antes de testes em modelos animais (ZATTONI *et al.*, 2022). Um exemplo foi o desenvolvimento de inibidores seletivos do transportador ABCG2 baseado na estrutura das cromonas. Primeiramente foi identificada a cromona 6 g como potente inibidor de ABCG2, esse inibidor também foi capaz de reverter o fenótipo de resistência usando diferentes quimioterápicos, como o SN38 e a mitoxantrona (VALDAMERI, 2012). Apenas após esses estudos *in vitro* que a cromona 6 g, renomeada para MBL-II-141, foi testada em modelo animal (HONORAT *et al.*, 2014). Nesse estudo, o MBL-II-141 foi injetado por via intraperitoneal e utilizado por via oral, foi verificado que o medicamento é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica mesmo em baixas concentrações, também sendo eficaz em sensibilizar células que superexpressam para ABCG2 frente a presença do quimioterápico irinotecano, substrato da referida proteína. Além disso, este inibidor também foi eficaz de aumentar os níveis de irinotecano no cérebro, o que seria de interesse para diversas abordagens terapêuticas, como o tratamento de gliomas por exemplo (HONORAT *et al.*, 2014).

6 CONCLUSÕES

Atualmente, o mitotano é utilizado no tratamento de carcinoma adrenocortical. Diante dos resultados encontrados neste trabalho, é possível concluir que o mitotano apresenta valores de inibição de ABCG2 dentro da faixa de concentração de uso clínico (50 μ M). A partir desses resultados, é possível sugerir que o mitotano tem potencial para, futuramente ser utilizado em associação com quimioterápicos, substratos de ABCG2, para melhorar a eficácia do tratamento. Além disso, considerando que o mitotano não é um substrato dos dois principais transportadores ABC, a sugestão do uso desse medicamento isolado poderia ser ampliado para pacientes com comprovada MDR causada pelo transportador ABCG2.

REFERÊNCIAS

ALLIKMETS, Rando et al. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. **Cancer research**, v. 58, n. 23, p. 5337-5339, 1998.

8AMBUDKAR, Suresh V. et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7468-7485, 2003.

ASHBURN, Ted T.; THOR, Karl B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 673-683, 2004.

BATES, Susan E. et al. Mitotane enhances cytotoxicity of chemotherapy in cell lines expressing a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) which is also expressed by adrenocortical carcinomas. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 73, n. 1, p. 18-29, 1991.

BAGULEY, Bruce C. Multidrug resistance in cancer. **Multi-drug resistance in cancer**, p. 1-14, 2010.

BOUMENDJEL, A. et al. Targeting the multidrug ABCG2 transporter with flavonoidic inhibitors: in vitro optimization and in vivo validation. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 22, p. 3387-3401, 2011.

BUKOWSKI, Karol; KCIUK, Mateusz; KONTEK, Renata. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2020.

CANTORE, Mariangela et al. Design and synthesis of new selective P-gp substrates and inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 38, p. 5774-5778, 2016.

CRIFE, Larry D. et al. Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999.

Blood, **The Journal of the American Society of Hematology**, v. 116, n. 20, p. 4077-4085, 2010.

CHUFAN, E. E.; SIM, H.-M.; AMBUDKAR, S. V. Molecular basis of the polyspecificity of P-glycoprotein (ABCB1): recent biochemical and structural studies. **Advances in Cancer Research**, v. 125, p. 71–96, 2015.

DANØ, Keld. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 323, n. 3, p. 466-483, 1973.

CORSO, Claudia Rita et al. Pharmacological profile and effects of mitotane in adrenocortical carcinoma. **British journal of clinical pharmacology**, v. 87, n. 7, p. 2698-2710, 2021.

CUNHA, John P. **LYSODREN**. 2022. Disponível em: <https://www.rxlist.com/lysodren-drug.htm#description>. Acesso em: 28 fev. 2023.

DASSA, Elie; BOUIGE, Philippe. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Research in microbiology**, v. 152, n. 3-4, p. 211-229, 2001.

DEVITA, Vincent T.; CHU, Edward. A history of cancer chemotherapy. **Cancer research**, v. 68, n. 21, p. 8643-8653, 2008.

DI MICCO, S. et al. In Silico Identification and In Vitro Evaluation of New ABCG2 Transporter Inhibitors as Potential Anticancer Agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 725, jan. 2023.

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

EBERHARDT, Jerome et al. AutoDock Vina 1.2. 0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. **Journal of chemical information and modeling**, v. 61, n. 8, p. 3891-3898, 2021.

FALASCA, Marco; LINTON, Kenneth J. Investigational ABC transporter inhibitors. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 21, n. 5, p. 657-666, 2012.

GAGLIANO, Teresa et al. Mitotane enhances doxorubicin cytotoxic activity by inhibiting P-gp in human adrenocortical carcinoma cells. **Endocrine**, v. 47, p. 943-951, 2014.

GILLET, Jean-Pierre; GOTTESMAN, Michael M. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. **Multi-drug resistance in cancer**, p. 47-76, 2010.

GONZALEZ-FIERRO, Aurora; DUEÑAS-GONZÁLEZ, Alfonso. Drug repurposing for cancer therapy, easier said than done. In: Seminars in cancer biology. **Academic Press**, 2021. p. 123-131.

GOSE, T. et al. ABCG2 requires a single aromatic amino acid to “clamp” substrates and inhibitors into the binding pocket. **FASEB J**, v. 34, n. 4, p. 4890–4903, abr. 2020.

GOTTESMAN, Michael M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annual review of medicine**, v. 53, n. 1, p. 615-627, 2002.

HEE CHOI, Young; YU, Ai-Ming. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 5, p. 793-807, 2014.

HIGGINS, Christopher F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annual review of cell biology**, v. 8, n. 1, p. 67-113, 1992.

HOFMAN, J. et al. Interactions of Alectinib with Human ATP-Binding Cassette Drug Efflux Transporters and Cytochrome P450 Biotransformation Enzymes: Effect on Pharmacokinetic Multidrug Resistance. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 47, n. 7, p. 699–709, 1 jul. 2019.

INCA. **Estimativa 2020.** INCA. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/image/capa-estimativa-2020-publicacao_0.jpg> Acesso em: 12 julho. 2021.

INCA (Brasil). **O que é câncer?** 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 10 fev. 2023.

INCA (Brasil). **Tipos de câncer.** 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos>. Acesso em: 10 fev. 2023.

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

Maestro. New York, NYSchrödinger, **LLC**, abr. 2021.

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

KAPLAN, Gilla et al. Thalidomide for the treatment of AIDS-associated wasting. **AIDS research and human retroviruses**, v. 16, n. 14, p. 1345-1355, 2000.

KITA, Diogo Henrique et al. Polyoxovanadates as new P-glycoprotein inhibitors: insights into the mechanism of inhibition. **FEBS letters**, v. 596, n. 3, p. 381-399, 2022.

KOLITZ, Jonathan E. et al. Dose escalation studies of cytarabine, daunorubicin, and etoposide with and without multidrug resistance modulation with PSC-833 in untreated adults with acute myeloid leukemia younger than 60 years: final induction results of Cancer and Leukemia Group B Study 9621. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 21, p. 4290-4301, 2004.

LO IACONO, Marco et al. Molecular mechanisms of mitotane action in adrenocortical cancer based on in vitro studies. **Cancers**, v. 13, n. 21, p. 5255, 2021.

LUO, Ji et al. A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. **Cell**, v. 137, n. 5, p. 835-848, 2009.

MIRSKI, Shelagh EL; GERLACH, James H.; COLE, Susan PC. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer research*, v. 47, n. 10, p. 2594-2598, 1987.

MIYATA, Hiroshi et al. Identification of febuxostat as a new strong ABCG2 inhibitor: potential applications and risks in clinical situations. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 518, 2016.

MO, Wei; ZHANG, Jian-Ting. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 3, n. 1, p. 1, 2012.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MYSURU SHIVANNA, Lohith; UROOJ, Asna. A review on dietary and non-dietary risk factors associated with gastrointestinal cancer. **Journal of gastrointestinal cancer**, v. 47, p. 247-254, 2016.

NARAYANAN, Deevya L.; SALADI, Rao N.; FOX, Joshua L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **International journal of dermatology**, v. 49, n. 9, p. 978-986, 2010.

O'KEEFFE, Linda M. et al. Smoking as a risk factor for lung cancer in women and men: a systematic review and meta-analysis. **BMJ open**, v. 8, n. 10, p. e021611, 2018.

OLSSON, M. H. M. et al. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 2, p. 525–537, 8 fev. 2011.

ORLANDO, Benjamin J.; LIAO, Maofu. ABCG2 transports anticancer drugs via a closed-to-open switch. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 2264, 2020.

ÖZVEGY-LACZKA, C. et al. Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: major differences in transport capacity and substrate recognition. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1668, n. 1, p. 53–63, 1 fev. 2005.

TAMAKI, Akina et al. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. **Essays in biochemistry**, v. 50, p. 209-232, 2011.

PALMEIRA, A. et al. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 13, p. 1946-2025, 2012.

POLGAR, Orsolya; ROBEY, Robert W.; BATES, Susan E. ABCG2: structure, function and role in drug response. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2008.

REGULSKA, Katarzyna et al. Can cardiovascular drugs support cancer treatment? The rationale for drug repurposing. **Drug discovery today**, v. 24, n. 4, p. 1059-1065, 2019.

REES, Douglas C.; JOHNSON, Eric; LEWINSON, Oded. ABC transporters: the power to change. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 10, n. 3, p. 218-227, 2009.

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

ROBEY, Robert et al. The challenge of exploiting ABCG2 in the clinic. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 595-608, 2011.

ROBERT, Jacques; JARRY, Christian. Multidrug resistance reversal agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 23, p. 4805-4817, 2003.

RUDRAPAL, Mithun; KHAIRNAR, Shubham J.; JADHAV, Anil G. Drug repurposing (DR): an emerging approach in drug discovery. **Drug repurposing-hypothesis, molecular aspects and therapeutic applications**, v. 10, 2020.

SASITHARAN, K. et al. ABCB1 Does Not Require the Side-Chain Hydrogen-Bond Donors Gln347, Gln725, Gln990 to Confer Cellular Resistance to the Anticancer Drug Taxol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8561, jan. 2021.

SARKADI, Balázs; HOMOLYA, László; HEGEDŰS, Tamás. The ABCG2/BCRP transporter and its variants—from structure to pathology. **FEBS letters**, v. 594, n. 23, p. 4012-4034, 2020.

SINGHAL, Seema et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 21, p. 1565-1571, 1999.

SØNDERGAARD, C. R. et al. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 7, p. 2284–2295, 12 jul. 2011.

SRIKANT, Sriram; GAUDET, Rachelle. Mechanics and pharmacology of substrate selection and transport by eukaryotic ABC exporters. **Nature structural & molecular biology**, v. 26, n. 9, p. 792-801, 2019.

STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 11, p. 2324–2337, 23 nov. 2015.

STEWART, J. P., J. MOPAC2016. Colorado Springs, **USA Stewart Computational Chemistry**, 2016.

SKEEL, Roland T.; KHLEIF, Samir N. (Ed.). **Handbook of cancer chemotherapy**. Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

TALEVI, Alan; BELLERA, Carolina L. Challenges and opportunities with drug repurposing: finding strategies to find alternative uses of therapeutics. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 15, n. 4, p. 397-401, 2020.

TELBISZ, Ágnes et al. Antibody binding shift assay for rapid screening of drug interactions with the human ABCG2 multidrug transporter. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 45, n. 1-2, p. 101-109, 2012.

TORRE, Lindsey A. et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 25, n. 1, p. 16-27, 2016.

VALDAMERI, Glaucio et al. Investigation of chalcones as selective inhibitors of the breast cancer resistance protein: critical role of methoxylation in both inhibition potency and cytotoxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 7, p. 3193-3200, 2012.

WU, Song et al. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 3490, 2018.

WU, Song et al. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. **Nature**, v. 529, n. 7584, p. 43-47, 2016.

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

ZHOU, Gaochao et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **The Journal of clinical investigation**, v. 108, n. 8, p. 1167-1174, 2001.

WASZUT, U.; SZYSZKA, P.; DWORAKOWSKA, D. Understanding mitotane mode of action. **J Physiol Pharmacol**, v. 68, n. 1, p. 13-26, 2017.

WAGHRAY, Deepali; ZHANG, Qinghai. Inhibit or evade multidrug resistance P-glycoprotein in cancer treatment: Miniperspective. **Journal of medicinal chemistry**, v. 61, n. 12, p. 5108-5121, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2021. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em: 04 março. 2023.

YU, Qin et al. Structures of ABCG2 under turnover conditions reveal a key step in the drug transport mechanism. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 4376, 2021.