

LUCIANA PEREIRA RANGEL

Estudo comparativo de chalconas e derivados do ácido gálico na reversão da resistência a múltiplas drogas promovida pela Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae* e ABCG2 de humanos: contribuição para o entendimento dos mecanismos de inibição e transporte



Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) visando a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

RANGEL, Luciana Pereira

Estudo comparativo de chalconas e derivados do ácido gálico na reversão da resistência a múltiplas drogas promovida pela Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae* e ABCG2 de humanos: contribuição para o entendimento dos mecanismos de inibição e transporte. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

xx, 144 p.,il.

Tese: Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

1. Resistência a múltiplas drogas
2. Pdr5p
3. ABCG2
4. inibidores

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro - IMPPG

II. Título.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Microbiana, do Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ, sob a orientação do Professor Antônio Ferreira Pereira. Parte dos resultados foram obtidos durante período de doutorado sanduíche, sob a supervisão do Dr. Attilio Di Pietro, no Institute de Biologie et Chimie des Protéines, Université Lyon I/ CNRS, França.

Agradeço sinceramente a todos que, direta ou indiretamente,
ajudaram na realização deste trabalho.

*Para minha família, em especial Ota, mamãe, papai, Chico e Marie,
sempre em meu pensamento.*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Resistência a múltiplas drogas.....	01
1.2. Transportadores ABC.....	05
1.2.1. Histórico.....	05
1.2.2. Definição.....	06
1.2.3. Mecanismo proposto para os transportadores ABC.....	10
1.2.3.1. Reconhecimento de substratos pelos transportadores ABC..	10
1.2.3.2. Atividade Catalítica dos transportadores ABC.....	13
1.3. Resistência a múltiplas drogas conferida por transportadores ABC no Câncer.....	14
1.4. A proteína ABCG2.....	16
1.4.1. Substratos e inibidores para ABCG2.....	19
1.5. Resistência a múltiplas drogas em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.6. A proteína Pdr5p.....	22
1.6.1. Substratos e moduladores da Pdr5p.....	25
1.7. A busca pela reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas....	28

1.7.1. Derivados do ácido gálico e classes de chalconas na resistência a múltiplas drogas.....	31
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1. Reagentes.....	35
3.2. Crescimento da cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AD12345678.....	35
3.3. Isolamento de membranas plasmáticas de <i>S. cerevisiae</i>	44
3.4. Medida da atividade NTPásica da Pdr5p.....	45
3.5. Efluxo de rodamina 6G por células intactas <i>S. cerevisiae</i>	46
3.6. Análise qualitativa do acúmulo de Rodamina 6G por microscopia de fluorescência.....	47
3.7. Cultura de células HEK-293.....	47
3.8. Citometria de fluxo.....	48
3.9. Preparação de Membranas de células HEK-293.....	49
3.10. Atividade ATPásica da ABCG2.....	50
3.11. Ensaios de citotoxicidade.....	51
3.12. Análises estatísticas.....	51

4. RESULTADOS.....	53
4.1. Efeito dos derivados de ácido gálico sobre a atividade ATPásica da Pdr5p.....	53
4.2. Inibição da atividade NTPásica da Pdr5p pelos galatos de decila e dodecila.....	55
4.3. Tipo de inibição promovida pelo decil e dodecil galato sobre a atividade ATPásica da Pdr5p.....	59
4.4. Efeito dos derivados de ácido gálico sobre o efluxo de rodamina 6G pela Pdr5p.....	59
4.5. Efeito das diferentes séries de chalconas sobre o efluxo de rodamina 6G pela Pdr5p.....	62
4.6. Inibição do efluxo de rodamina 6G pelas chalconas selecionadas das séries H, L e R.....	67
4.7. Efeito das diferentes séries de chalconas sobre a atividade ATPásica da Pdr5p.....	70
4.8. Efeito dos derivados de ácido gálico sobre o acúmulo de mitoxantrona pela ABCG2 de humanos.....	74
4.9. Efeito das diferentes séries de chalconas sobre o transporte da ABCG2.....	76
4.10. Curvas de dose-resposta com os compostos selecionados das séries	

L, R e H.....	81
4.11. Modo de inibição das chalconas estudadas sobre ABCG2.....	81
4.12. Efeito das diferentes séries de chalconas sobre a Atividade ATPásica da ABCG2.....	86
4.13. Citotoxicidade das chalconas selecionadas.....	90
4.14. Reversão da resistência a mitoxantrona pelas chalconas selecionadas.....	90
4.15. Efeito das diferentes séries de chalconas sobre o transporte da glicoproteína-P.....	95
4.16. Efeito das diferentes séries de chalconas sobre o transporte da MRP1.....	99
5. DISCUSSÃO.....	103
6. CONCLUSÕES.....	120
7. PERSPECTIVAS.....	122
8. BIBLIOGRAFIA.....	123

RESUMO

A resistência a múltiplas drogas é um dos mais preocupantes fenômenos observados na quimioterapia atualmente. Nela, células tornam-se resistentes aos quimioterápicos utilizados na clínica, diminuindo o arsenal de drogas disponíveis para estes tratamentos. Isto pode ser causado por transportadores da família ABC, que são capazes de expulsar compostos das células em que são expressos, utilizando para isso a energia liberada pela hidrólise de ATP. Eles são encontrados nas mais diversas espécies, de bactérias a mamíferos, sendo superexpressos em células cancerosas. Uma abordagem na tentativa de superar este problema é o uso de substâncias re-sensibilizadoras, ou seja, compostos capazes de potencializar a eficácia dos quimioterápicos já existentes. Neste trabalho, exploramos os efeitos de duas classes de compostos, os derivados do ácido gálico e as chalconas, na inibição de dois tipos de transportadores, a Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae* e a ABCG2 de humanos. Os derivados do ácido gálico demonstraram aumento da eficácia na inibição da Pdr5p com o aumento da cadeia lateral, sendo que os melhores, os galatos de decila e dodecila, se mostraram capazes de inibir competitivamente a atividade ATPásica desta proteína, além de inibirem o efluxo de rodamina 6G pelas células que superexpressam a Pdr5p.

As chalconas utilizadas neste trabalho, derivadas da 3,4-metilenodioxo-acetofenona, da 2-naftilacetofenona ou hidroxichalconas, demonstraram ser bons inibidores para a ABCG2, já que algumas foram capazes de induzir uma inibição superior à promovida pelo GF120918, um inibidor de referência para ABCG2. A variação nos padrões de substituição dos dois anéis presentes na estrutura básica desses compostos levou a diferentes graus de

inibição e os melhores resultados foram alcançados com substituintes eletronegativos e hidrofóbicos. Os valores de IC_{50} ficaram na faixa de $0,2 \mu M$, e estas aparentam realizar esta inibição de forma não-competitiva. Esses inibidores também foram capazes de aumentar a sensibilidade das células que superexpressam ABCG2 à mitoxantrona e foram classificados como inibidores específicos para esta proteína, por não produzirem efeitos sobre o transporte das proteínas P-gp e MRP1.

ABSTRACT

Multidrug resistance is one of the most preoccupying phenomena observed in chemotherapy nowadays. In this phenomenon, cells become resistant to chemotherapeutics used in clinics, reducing the drug arsenal available for these treatments. This may be caused by transporters belonging to the ABC family, which are capable to extrude compounds from the cells in which they are expressed using the energy released by ATP hydrolysis. They can be found in all species, from bacteria to mammals, and are overexpressed in cancer cells. A way to overcome this problem is the use of chemosensitizers, compounds that are able to increase the efficacy of the already existent drugs. In this work, we have explored the effects of two classes of compounds, gallic acid derivatives and chalcones, on two types of transporters, *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p and human ABCG2. The gallic acid derivatives were shown to increment the efficacy of Pdr5p inhibition with the increase of the side chain length and the best ones, decyl and dodecyl gallates have shown to competitively inhibit the ATPase activity of this protein, also with the inhibition of rhodamine 6G efflux by cells which overexpress Pdr5p.

The chalcones used in this work, derivatives of either 3,4-methylenedioxyacetophenone, 2-naphthylacetophenone or hydroxychalcones, were shown to be good inhibitors for ABCG2, as some were able to induce a greater inhibition than that obtained with GF120918, a reference inhibitor for ABCG2. The variation on the pattern of substitution on both rings present on the basic structure of these compounds lead to different degrees of inhibition, and the best results were achieved with electronegative and hydrophobic substituents. The IC₅₀ values achieved are in the range of 0.2 μM, apparently

through non-competitive inhibition. These inhibitors were also able to increase the sensitivity of cells overexpressing ABCG2 to mitoxantrone and were classified as specific inhibitors for ABCG2, as they showed no effect on P-gp and MRP1 transport.

ABREVIACOES

- **ABCB1** produto do gene *ABCB1* de humanos
- **ABCC1** produto do gene *ABCC1* de humanos
- **ABCG2** produto do gene *ABCG2* de humanos
- **ADP** Adenosina 5'-difosfato
- **AEBSF** fluoreto de 4-(2-Aminoetil) benzenosulfonila hidrocloreto
- **ANSA** cido 1-amino 2-naftol 4-sulfnico
- **ATP** Adenosina 5'-trifosfato
- **BCRP** sinnimo de ABCG2
- **CTP** Citosina 5'-trifosfato
- **DMEM** Meio de cultura, do inglês “Dulbecco Modified Eagle Medium”
- **DMSO** Dimetilsulfóxido
- **DTT** 1,4-Ditio-DL-treitol
- **EGTA** cido [etilenobis(oxietilenonitrila)] tetracético
- **FK506** Tacrolimus
- **G418** Gentamicina
- **GF120918** Elacridar
- **GTP** Guanosina 5'-trifosfato
- **HEK-293** Linhagem celular de origem renal, do inglês “Human Embryonic Kidney”.
- **IC₅₀** Concentrao em que se atinge 50% de inibio

- **ITP** Inositol 1,4, 5- trifosfato, sinônimo de IP3
- **K_d** Constante de dissociação
- **K_i** Constante de inibição
- **MATE** do inglês, Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family
- **MDR** Resistência múltipla a drogas (do inglês multidrug resistance)
- **MDR1** sinônimo de ABCB1
- **MFC** Concentração mínima fungicida (do inglês, “Minimum Fungicidal Concentration”)
- **MFS** do inglês, Major Facilitator Superfamily
- **MIC** Concentração mínima inibitória (do inglês, Minimum Inhibitory Concentration)
- **MK571** Ácido (E)-3-[[[3-[2-(7-Cloro-2-quinolinil)etenil]fenil]-[[3-dimetilamino)-3-oxopropil]tio]metil]tio]-propanóico
- **MRP1** sinônimo de ABCC1
- **MTT** brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- **NBD** Domínio de Ligação de Nucleotídeos (do inglês, “Nucleotide Binding Domain”)
- **ORF** do inglês, Open Reading Frame
- **PBS** Tampão Salina Fosfato
- **Pdr5p** Produto do gene PDR5, de *Saccharomyces cerevisiae*
- **P-gp** Glicoproteína-P
- **Pi** Fosfato inorgânico
- **PKC** Proteína cinase C

- **PMSF** Fluoreto de fenilmetilsulfonila
- **RND** do inglês, Resistance-nodulation-cell Division Family
- **SDS** Dodecil sulfato de sódio
- **SMR** do inglês, Small MDR superfamily
- **TFP** Trifluoperazina
- **TMD** domínio transmembranar
- **TMS** Segmento Transmembranar (do inglês, “Transmembrane Segment”)
- **Tris** Tris (hidroximetil) aminometano
- **UTP** Uridina 5’ – trifosfato
- **YPD** Meio de crescimento composto por extrato de levedura, peptona e dextrose (do inglês, Yeast Extract, Peptone, Dextrose)

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Representação esquemática do efluxo e acúmulo de drogas em células sensíveis e resistentes a drogas.....	03
Figura 2. Visão geral das famílias de transportadores de múltiplas drogas (MDR).....	04
Figura 3. Possíveis topologias e configurações para os domínios transmembranares e de ligação a nucleotídeos dos transportadores ABC.....	09
Figura 4. Modelos propostos para o mecanismo dos Transportadores da Superfamília ABC.....	12
Figura 5. Ciclo catalítico proposto para os transportadores ABC.....	15
Figura 6. Estratégias para superar a resistência a múltiplas drogas.....	30
Figura 7. Estrutura básica dos compostos utilizados neste trabalho.....	33
Figura 8. Derivados de ácido gálico utilizados neste trabalho.....	36
Tabela I. Chalconas da Série L – derivados da 3,4-metilenodioxiacetofenona.....	37
.	
Tabela II. Chalconas da Série R – derivados da 2-naftilacetofenona.....	40
Tabela III. Chalconas da Série H – Hidroxichalconas.....	43
Figura 9. Atividade ATPásica da Pdr5p na presença dos diferentes derivados do ácido gálico.....	54
Figura 10. Curvas de inibição realizadas com os derivados do ácido gálico.....	56
Figura 11. Curvas de inibição da atividade UTPásica da Pdr5p na presença dos galatos de decila e dodecila.....	57

Tabela IV. Valores de K_i aparente para a inibição promovida pelos galatos de decila e dodecila utilizando ATP ou UTP como substrato.....	58
Figura 12. Tipo de inibição da atividade ATPásica da Pdr5p pelos derivados de ácido gálico.....	60
Figura 13. Efeito dos derivados do ácido gálico sobre o transporte de Rodamina 6G pela Pdr5p.....	61
Figura 14. Curva de dose-resposta dos galatos de decila e dodecila sobre o transporte de Rodamina 6G pela Pdr5p, medido por fluorescência do sobrenadante.....	63
Figura 15. Efeito dos galatos de decila e dodecila sobre o transporte de rodamina 6G.....	64
Figura 16. Efeito das chalconas da série L (derivados da 3,4-metilenodioxiacetofenona) sobre o efluxo de rodamina pela cepa AD124567.....	65
Figura 17. Efeito das chalconas da série R (derivadas da 2-naftilacetofenona) sobre o efluxo de rodamina pela cepa AD124567.....	66
Figura 18. Efeito das chalconas da série H (hidroxichalconas) sobre o efluxo de rodamina pela cepa AD124567.....	68
Figura 19. Curvas de dose-resposta com os compostos selecionados HA4, R32 e L2 sobre o efluxo de rodamina 6G pela cepa AD124567.....	69
Figura 20. Efeito das chalconas da série L sobre a atividade ATPásica da Pdr5p de <i>S. Cerevisiae</i>	71
Figura 21. Efeito das chalconas da série R sobre a atividade ATPásica da Pdr5p de <i>S. Cerevisiae</i>	72

Figura 22. Efeito das chalconas da série H sobre a atividade ATPásica da Pdr5p de <i>S. Cerevisiae</i>	73
Figura 23. Efeito dos derivados do ácido gálico sobre o acúmulo de mitoxantrona pela células HEK-293pcDNA3ABCG2.....	75
Figura 24. Efeito das chalconas da série L sobre o acúmulo de mitoxantrona pelas células HEK-293pcDNA3ABCG2.....	78
Figura 25. Efeito das chalconas da série R sobre o acúmulo de mitoxantrona pelas células HEK-293pcDNA3ABCG2.....	79
Figura 26. Efeito das chalconas da série H sobre o acúmulo de mitoxantrona pelas células HEK-293pcDNA3ABCG2.....	80
Tabela V. Valores de IC ₅₀ obtidos a partir do ajuste matemático das curvas de inibição da ABCG2 pelas chalconas das séries L, R e H.....	83
Figura 27. Curvas de inibição do efluxo de mitoxantrona pelas chalconas selecionadas.....	84
Figura 28. Tipo de inibição do transporte de Mitoxantrona por chalconas das série L, R e H.....	85
Figura 29. Efeito das chalconas da série L sobre a atividade ATPásica da ABCG2.....	87
Figura 30. Efeito das chalconas da série R sobre a atividade ATPásica da ABCG2.....	88
Figura 31. Efeito das chalconas da série H sobre a atividade ATPásica da ABCG2.....	89
Figura 32. Citotoxicidade das chalconas utilizadas neste trabalho.....	92

Figura 33. Efeito de sensibilização à mitoxantrona pelas chalconas selecionadas das séries H, L e R.....	93
Tabela VI. Valores de IC ₅₀ da mitoxantrona para as células HEK-293 <i>pcDNA3 ABCG2</i> na presença ou ausência das chalconas (1 µM) e para as células HEK-293 <i>pcDNA3</i>	94
Figura 34. Efeito das chalconas da série L sobre o acúmulo de mitoxantrona promovido pela Glicoproteína-P.....	96
Figura 35. Efeito das chalconas da série R sobre o acúmulo de mitoxantrona promovido pela Glicoproteína-P.....	97
Figura 36. Efeito das chalconas da série H sobre o acúmulo de mitoxantrona promovido pela Glicoproteína-P.....	98
Figura 37. Efeito das chalconas da série L a 10µM sobre o transporte de calceína pela linhagem de células HEK-293 que superexpressa MRP1.....	100
Figura 38. Efeito das chalconas da série R a 10 µM sobre o transporte de calceína pela linhagem de células HEK-293 que superexpressa MRP1.....	101
Figura 39. Efeito das chalconas da série H a 10µM sobre o transporte de calceína pela linhagem de células HEK-293 que superexpressa MRP1.....	102
Figura 40. Estruturas de espécies químicas.....	110
Figura 41. Esquema para a interação de flavonóis e prenil-flavonóides com a glicoproteína-P de mamíferos e transportadores de múltiplas drogas relacionados	111
Figura 42. Modelos estruturais propostos para dois transportadores ABC.....	113

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resistência a múltiplas drogas

A resistência a drogas na quimioterapia antifúngica, bem como na quimioterapia antibacteriana e anticâncer, é a maior causa de falhas destes tratamentos. Os microrganismos patogênicos e as células cancerosas desenvolveram diversos mecanismos para escapar do ataque dos quimioterápicos, dentre os quais, um dos mais importantes e preocupantes é a resistência a múltiplas drogas (LAGE, 2003).

A resistência a múltiplas drogas ou MDR (do inglês “Multidrug Resistance”) consiste na resistência celular a diversos quimioterápicos estrutural e funcionalmente diferentes, que apresentam, de forma geral, uma única característica em comum que é o seu caráter hidrofóbico. Este fenótipo caracteriza-se pela capacidade de expulsão de drogas presentes no interior da célula, ou ainda na membrana plasmática, com conseqüente redução de sua concentração no meio intracelular (GOTTESMAN & PASTAN 1993), como mostrado na Figura 1.

Este tipo de MDR, chamado de “clássico”, foi descrito primeiramente para células cancerosas, sendo promovido por uma proteína transportadora transmembranar, chamada de Glicoproteína-P (P-gp), codificada pelo gene *MDR1* (RONINSON *ET AL.*, 1986), atualmente classificado como *ABCB1* pelas novas regras de nomenclatura estabelecidas pelo HGNC (do inglês, “Human Genome Organisation Gene Nomenclature Comitee”). A resistência promovida por esta proteína já está bem caracterizada, existindo um espectro

bem definido de substratos para seu transporte, bem como de inibidores, que podem também ser chamados de moduladores ou reguladores de MDR. Após sua descoberta, um grande número de proteínas homólogas foi descrito em diferentes organismos (LAGE, 2003).

Estas proteínas pertencem à superfamília dos transportadores ABC (do inglês “ATP-binding cassette”), mas existem, numa visão mais ampla, muitas outras famílias de transportadores de múltiplas drogas (LAGE, 2003). Todas essas famílias são responsáveis pelos fenótipos de MDR em microrganismos patogênicos, assim como em células cancerosas.

Esses sistemas transportadores estão presentes em todos os organismos estudados até o presente momento e podem ser divididos em duas classes majoritárias (Figura 2). A primeira classe é composta de proteínas capazes de realizar transporte ativo primário, utilizando como energia a hidrólise de ATP. Estes transportadores representam a superfamília dos transportadores ABC. A segunda classe é composta de proteínas capazes de realizar transporte ativo secundário, acoplado a um gradiente de íons, como sódio ou prótons, através de simporte ou antiporte. Os membros desta classes são as SMR (do inglês “Small MDR Superfamily”), MATE (“Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family”), RND (“Resistance-nodulation-cell Division Family”) e MFS (“Major Facilitator Superfamily”) (PUTMAN ET AL., 2000).

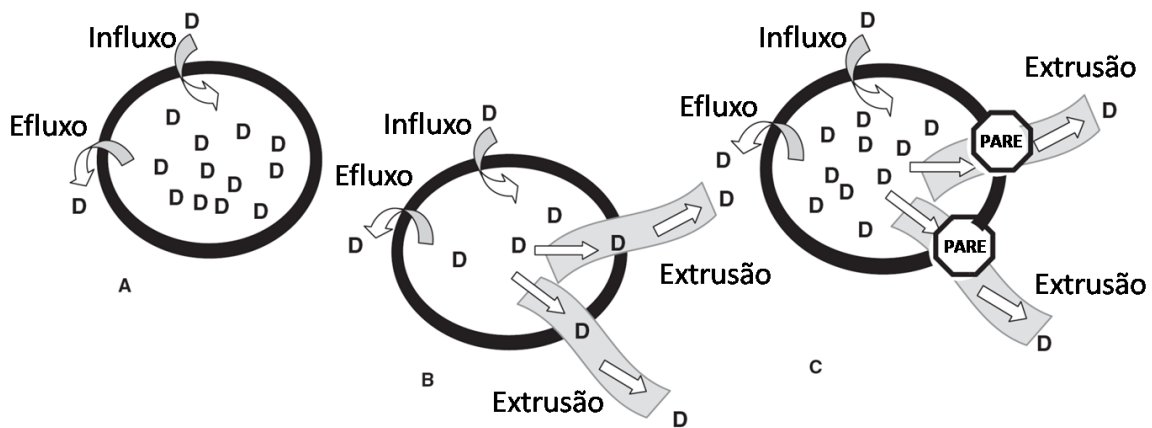


Figura 1. Representação esquemática do efluxo e acúmulo de drogas em células sensíveis e resistentes a drogas. (A) Célula sensível a drogas. As moléculas da droga (D) se difundem através da membrana celular. O influxo é maior que o efluxo devido à direção do gradiente eletroquímico estabelecido para a droga, permitindo um acúmulo da droga no interior da célula. **(B)** Célula resistente a drogas. Além da difusão da droga através da membrana, a droga presente no interior celular é bombeada para o exterior por um transportador, reduzindo drasticamente o nível intracelular da droga. **(C)** Uma célula cujo fenótipo de resistência a drogas foi revertido. A expulsão da droga está diminuída ou é nula, levando a um acúmulo semelhante ao observado para a célula originalmente sensível. (retirado e adaptado de PEER & MARGALIT, 2005).

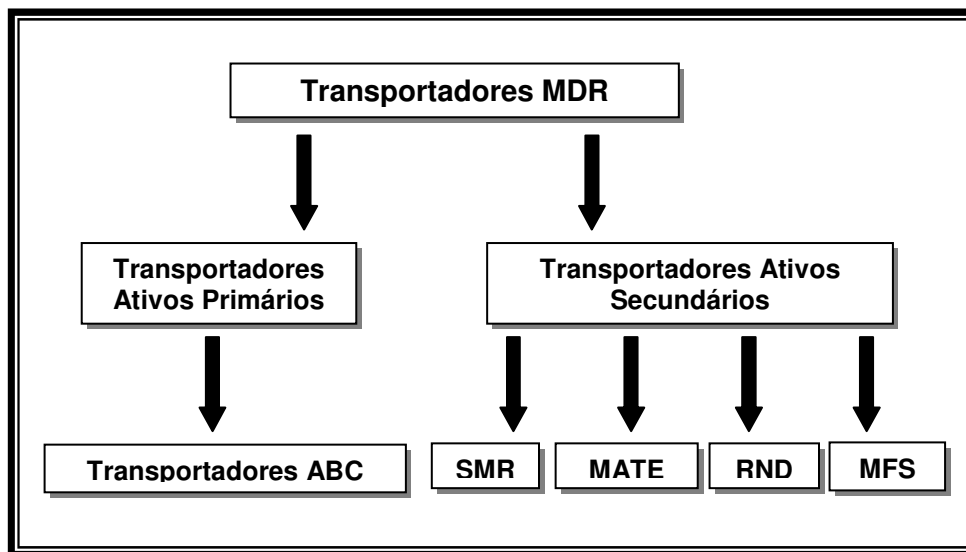


Figura 2. Visão geral das famílias de transportadores de múltiplas drogas (MDR).

SMR: do inglês, Small MDR superfamily; MATE: Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family; RND: Resistance-nodulation-cell Division Family; MFS: Major Facilitator Superfamily (Adaptado DE LAGE, 2003).

1.2. Transportadores ABC

1.2.1. Histórico

O estudo dos transportadores ABC teve início na década de 1970. Este tipo de transportador foi descrito inicialmente em bactérias, e estes foram os primeiros a serem identificados e caracterizados (revisto por HIGGINS, 2001). BERGER & HEPPEL, em 1974, descreveram uma classe de sistemas transportadores, capaz de realizar transporte primário, sensível ao choque osmótico e cuja energia para o funcionamento provinha diretamente da hidrólise de ATP. Estes transportadores descritos eram sensíveis ao choque osmótico devido à perda da sua proteína de ligação ao substrato. Observou-se, após a conclusão do sequenciamento de OppD (um transportador de oligopeptídeos de *Salmonella typhimurium*) (HIGGINS *et al.*, 1982), que essas proteínas apresentavam uma região de ligação a nucleotídeos bastante conservada, encontrada também em outras proteínas, como ATP sintase, miosina e adenilato cinase (WALKER *et al.*, 1982). Isso levou à sugestão de que esses domínios estariam envolvidos no acoplamento da hidrólise do ATP à função realizada pela proteína e que esses transportadores pertenceriam a uma mesma família (Mimmack *et al.*, 1989).

A primeira proteína de eucariotos pertencente à família dos Transportadores ABC foi descrita em 1986. Tratava-se da glicoproteína-P de mamíferos (GROS *et al.*, 1986), envolvida na resistência de células cancerosas à quimioterapia. Neste mesmo ano, foi proposto que estes transportadores estariam organizados em quatro domínios principais. Porém notou-se que nem todos os membros desta superfamília apresentavam a função de

transporte, podendo estar envolvidos em outros processos biológicos (HIGGINS *et al.*, 1986). O nome ABC (do inglês “ATP binding cassette”) foi proposto em 1990 por HYDE e colaboradores, reconhecendo a importância desta origem evolucionária comum entre proteínas com funções tão diversas.

1.2.2. Definição

Os transportadores ABC podem ser encontrados em todos os filós e compõem uma das maiores famílias de proteínas, participando em diversos processos bioquímicos que serão abordados ao longo desta tese. Esses processos vão desde o transporte de íons cloreto em células epiteliais respiratórias, onde uma disfunção leva ao desenvolvimento da fibrose cística, até a resistência a múltiplas drogas em microrganismos e no câncer (HIGGINS *et al.*, 1992).

Todas as proteínas da superfamília ABC apresentam uma seqüência altamente conservada, de aproximadamente 215 aminoácidos, denominada de ABC ou de NBD (do inglês, “Nucleotide Binding Domain”). Este domínio contém dois segmentos peptídicos curtos chamados de “Walker A” e “Walker B” (WALKER *et al.*, 1982). O segmento “Walker A” é uma região rica em glicina e “Walker B” é uma seqüência hidrofóbica. Ambos estão envolvidos na ligação de ATP e estão freqüentemente presentes em todas as proteínas ligadoras de nucleotídeos. Uma terceira seqüência consenso (“LSGGQ”) é conhecida como “assinatura” ABC e é exclusiva dos domínios ABC (HYDE *et al.*, 1990).

Os transportadores ABC apresentam uma organização estrutural comum, na qual, associado ao sítio de ligação a nucleotídeos, temos um domínio transmembranar (TMD), geralmente composto de seis alfa-hélices que atravessam a membrana (revisto por ENDICOTT & LING, 1989).

Para que um transportador ABC tenha atividade biológica, acredita-se que a estrutura mínima seja de dois sítios de ligação a nucleotídeos associados a dois domínios transmembranares. Em geral, os transportadores de organismos eucarióticos se apresentam sob a forma de transportadores completos, que consistem em um único polipeptídeo, apresentando uma topologia [TMD-NBD]₂ ou [NBD-TMD]₂, chamada de configuração invertida (Figura 3). Por outro lado, os transportadores de procariotos costumam ter seus domínios expressos como subunidades separadas, contendo um NBD ligado a um TMD, que, para serem ativos, em geral, apresentam-se sob a forma de dímeros, podendo ser homodímeros (duas cadeias de proteínas codificadas pelo mesmo gene) ou heterodímeros (compostos de duas proteínas diferentes). Apesar de os NBDs apresentarem grande homologia nos transportadores ABC de todas as origens filogenéticas, os segmentos transmembranares costumam apresentar grande variabilidade em suas seqüências e, por isso, acredita-se que nestas regiões estejam localizados os sítios de ligação de drogas (para revisão, ver Altenberg, 2003). Acredita-se que a comunicação entre o TMD e o NBD seja promovida por uma região chamada de domínio intracelular (POLGAR, ROBEY & BATES, 2008).

A superfamília dos transportadores ABC divide-se em diversas subfamílias, dentre elas a MRP (do inglês “Multidrug Resistance Protein”), caracterizada pelo transporte de substâncias geralmente conjugadas a glutatona, a MDR, na qual se incluem os genes que codificam as glicoproteínas-P de humanos e mamíferos em geral, e a PDR (do inglês “Pleiotropic Drug Resistance”), a família mais bem caracterizada em *Saccharomyces*

cerevisiae, cujos membros foram encontrados também em outros fungos, como *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, entre outros (DEL SORBO, SCHOONBEEK & DE WAARD, 2000).

Os membros da família ABC de humanos podem tanto funcionar como transportadores de membrana, canais de íons ou receptores. Essas proteínas podem estar localizadas na membrana plasmática, retículo endoplasmático, peroxissomas ou na mitocôndria. Dos 48 genes de transportadores humanos, 17 já foram associados à patogênese de doenças, que incluem as doenças de Tangier (*ABCA1*), Stargart (*ABCA4*), sitosterolemia (*ABCG5/ABCG8*) e a fibrose cística (*ABCC7/CFTR*), entre outras (POLGAR, ROBEY & BATES, 2008).

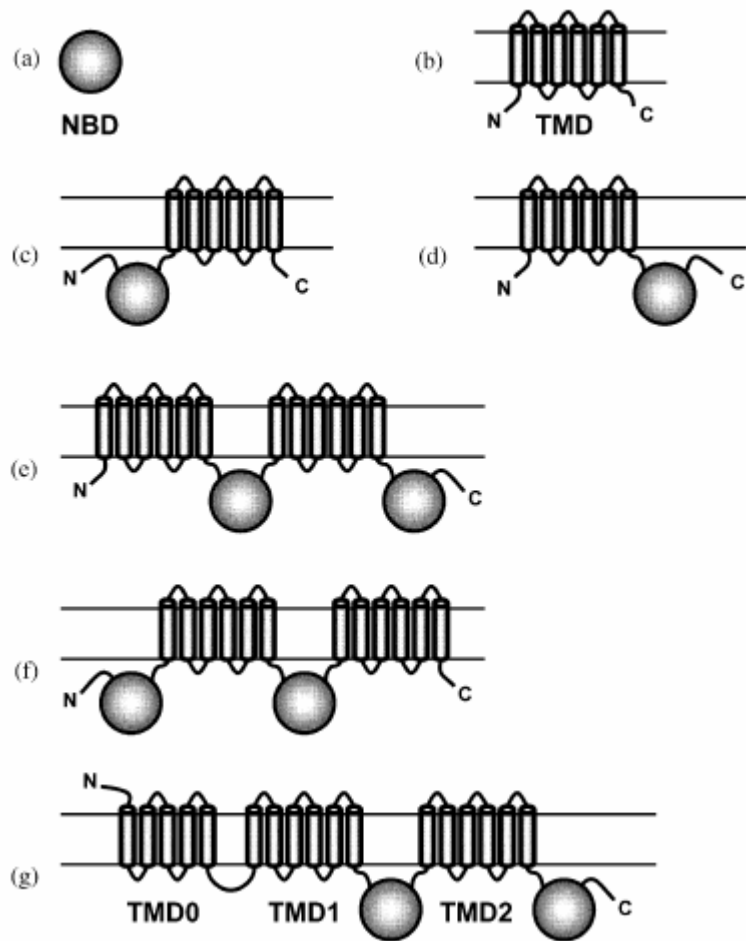


Figura 3. Possíveis topologias e configurações para os domínios transmembranares e de ligação a nucleotídeos dos transportadores ABC. (a) NBD, domínio de ligação a nucleotídeos. (b) TMD, domínio transmembranar. (c) monômero com a configuração [NBD-TMD]. (d) monômero com a configuração [TMD-NBD]. (e) dímero com a configuração [TMD-NBD]₂. (f) dímero com a configuração [NBD-TMD]₂. (f) transportador que apresenta um domínio transmembranar adicional, encontrado na família MRP (do inglês, multidrug resistance protein). Extraído de LAGE, 2003.

1.2.3. Mecanismos propostos para os Transportadores ABC

Acredita-se que os transportadores ABC envolvidos na resistência a múltiplas drogas possam ter um mecanismo molecular de transporte comum. Diversos modelos foram sugeridos para explicar sua ampla especificidade por compostos quimicamente tão diferentes (VARMA *et al.*, 2003).

Os modelos atualmente propostos para descrever o funcionamento dos transportadores ABC são três (Figura 4): o modelo de poro, o de aspirador hidrofóbico e o de flipase. O modelo de poro, também chamado de transporte convencional, é caracterizado pela remoção da droga após sua ligação ao transportador diretamente no citoplasma, passando por um poro aquoso (ALTENBERG *et al.*, 1994). No modelo de aspirador hidrofóbico, o mais aceito atualmente, ocorreria a ligação da droga ao transportador na folha interna da membrana plasmática e sua condução, através do interior do poro, ao meio extracelular (RAVIV *et al.*, 1990). No terceiro modelo proposto, a droga passaria da camada interna para a camada externa da membrana plasmática, através de ligações e/ou interações com os lipídios da membrana, sendo eliminada em seguida. Este mecanismo é chamado de flipase (HIGGINS & GOTTESMAN 1992).

1.2.3.1. Reconhecimento de substratos por Transportadores ABC

A capacidade dos transportadores de múltiplas drogas de se ligarem a um número grande de substâncias de estruturas bastante variadas foi considerada, por um longo tempo, como

inusitada entre os pesquisadores. A investigação clássica de diversas enzimas mostrou que elas são capazes de se ligar a um determinado substrato devido a interações atômicas específicas entre resíduos de aminoácidos da enzima e a molécula de substrato (STAVROVSKAYA & STROMSKAYA, 2008). Por isso, não é surpreendente que a noção de que o sítio de ligação a drogas dos transportadores ABC seja capaz de interagir com dezenas de moléculas de estruturas diversas tenha sido reconhecida por muitos anos como uma violação de um princípio fundamental da bioquímica. Felizmente, progressos na análise estrutural de transportadores ABC e algumas outras proteínas que reconhecem múltiplas substâncias ajudaram na solução deste mistério.

A forma pela qual os substratos se associam inicialmente aos transportadores ABC e as mudanças conformacionais decorrentes do mecanismo de transporte também vem sendo discutidas. Estudos com a P-gp demonstraram que no interior da membrana celular forma-se uma grande cavidade organizada pelas hélices transmembranares da proteína (ZHELEZNOVA *et al.*, 1999). Essa cavidade apresenta dois vãos laterais expostos para a membrana, através dos quais os substratos a ser transportados podem entrar na cavidade. Existem trabalhos que sugerem que os substratos podem ser captados pelo transportador a partir do espaço entre as duas camadas da membrana plasmática, e não no citoplasma (HIGGINS, 2007). Acredita-se que o mecanismo de ligação seja através da penetração dos ligantes na cavidade da proteína, onde estabelecem interações de Van Der Waals com os resíduos hidrofóbicos que o permeiam e, além disso, as dimensões da cavidade da proteína são suficientemente grandes para permitir diferentes orientações da molécula ligante, podendo ocorrer a interação da mesma com diferentes resíduos presentes na parede que

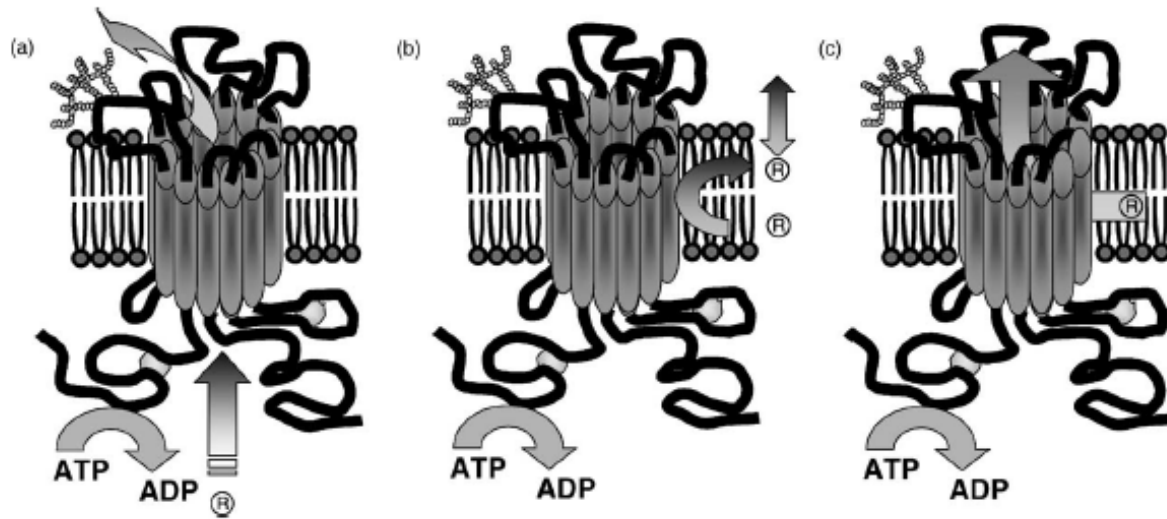


Figura 4. Modelos propostos para o mecanismo dos Transportadores da Superfamília ABC. (a) No modelo de poro, a droga se ligaria à proteína no citoplasma, sendo expulsa da célula através de um canal. No modelo de flipase (b), a droga presente na folha interna da membrana plasmática seria deslocada para a folha externa após a ligação à proteína, passando em seguida por difusão passiva para o meio extracelular, enquanto que no modelo de aspirador hidrofóbico (c), a droga, ainda na camada interna da membrana plasmática, seria captada pela proteína e expulsa através do canal (extraído de VARMA *et al.*, 2003).

forma a cavidade (NEYFAKH, 2003). Desta forma, de acordo com o modelo proposto, após a ligação do ATP ao NBD da P-gp, a conformação das hélices transmembranares da proteína muda fortemente, resultando no fechamento dos vãos laterais (NEYFAKH, 2003; ZHELEZNOVA *et al.*, 1999). Este processo seria acompanhado pela diminuição da afinidade do transportador pelo substrato, o que resultaria na dissociação do substrato que estava ligado à proteína ao meio extracelular.

1.2.3.2. Atividade Catalítica dos Transportadores ABC

A ligação do ATP e sua hidrólise são essenciais para o funcionamento dos transportadores ABC, sendo a estequiometria desta reação de uma molécula da droga transportada para cada duas moléculas de ATP hidrolisadas (GOTTESMAN & PASTAN, 1993). A reação global da P-gp de humanos foi proposta inicialmente por SENIOR e colaboradores (1995), revista por SAUNA e colaboradores em 2001 e por Suresh e colaboradores em 2007. Neste modelo, a reação é composta de dois ciclos, nos quais os sítios de ligação de ATP e drogas interagem de forma coordenada, para que a droga seja transportada para o exterior, num processo dependente de ATP (Figura 5).

A droga e a primeira molécula de ATP se ligam à proteína em seus respectivos sítios. Em seguida, ocorre a hidrólise do ATP em ADP + Pi, fornecendo energia para o transporte da droga. A liberação do ADP do sítio de ligação a nucleotídeos encerra o primeiro ciclo, que é seguido de uma mudança conformacional da proteína, capaz de reduzir a afinidade tanto pelo nucleotídeo, quanto pela droga. O segundo ciclo teria início

com a hidrólise de outra molécula de ATP, realizada pelo outro sítio de ligação a nucleotídeos, sendo esta energia liberada necessária para devolver a proteína a sua conformação original. A posterior liberação do ADP concluiria o segundo ciclo, tornando a P-gp capaz de iniciar um novo ciclo de transporte da droga.

1.3. Resistência a múltiplas drogas conferida por transportadores ABC no Câncer

No total, 48 transportadores ABC foram identificados no genoma humano e agrupados em sete subfamílias (de *ABCA* a *ABCG*), de acordo com as suas homologias sequenciais e estruturais (DEAN *et al.*, 2001). Destes, aqueles que foram comprovadamente associados ao fenômeno de resistência a múltiplas drogas são a glicoproteína-P (P-gp ou ABCB1), MRP1 (do inglês, “Multidrug resistance-associated protein 1”, ou ABCC1) e ABCG2, por existirem evidências relacionando culturas de células resistentes a drogas e material obtido de pacientes (DEAN *et al.*, 2001). Entretanto, pelo menos 17 desses transportadores tiveram sua capacidade de transporte de drogas *in vitro* demonstrada (LAGE, 2008), o que sugere um papel importante da variação no padrão de expressão dessas proteínas nas diferenças de susceptibilidade a drogas.

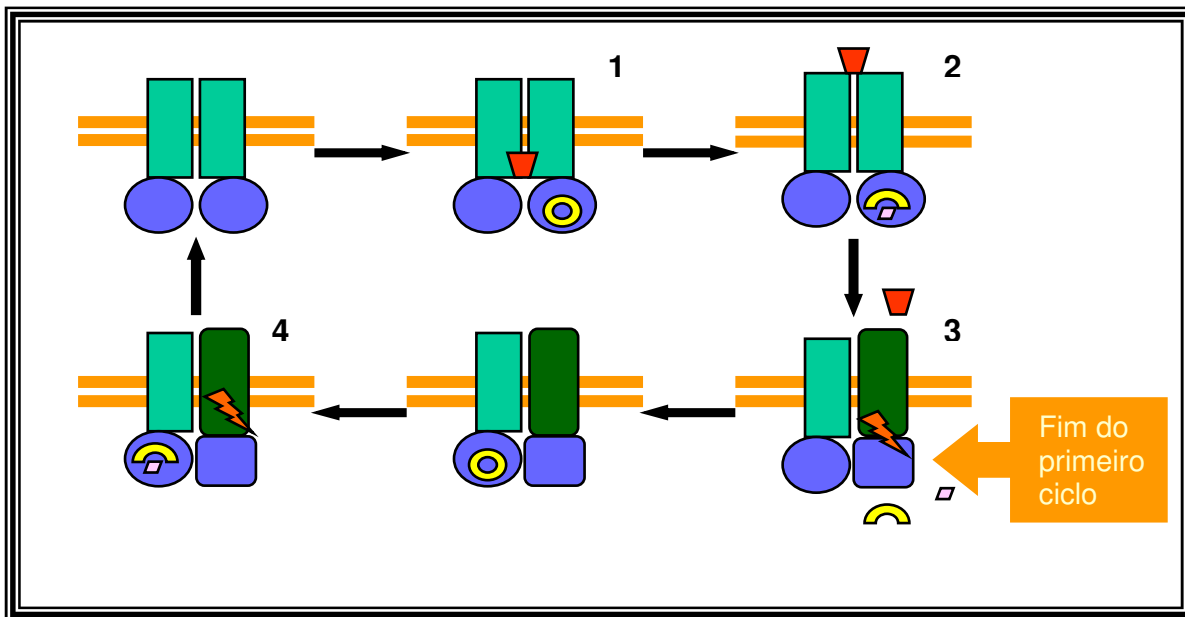


Figura 5. Ciclo catalítico proposto para os transportadores ABC. (proposto por nosso grupo a partir dos dados de SENIOR *et al.*, 1995, Sauna *et al.*, 2001). (1) A droga e a primeira molécula de ATP ligam-se à proteína em seus respectivos sítios. (2) Hidrólise do ATP em ADP + Pi, que fornece energia para o transporte da droga. (3) Fim do primeiro ciclo - liberação do ADP do sítio de ligação a nucleotídeos, com concomitante mudança conformacional gerada pela liberação do ADP que reduz a afinidade pelo nucleotídeo e pela droga. (4) Ligação de outra molécula de ATP, iniciando o segundo ciclo – a energia liberada é utilizada para devolver a proteína a sua conformação original. A posterior liberação do ADP conclui o segundo ciclo, fazendo com que a P-gp possa iniciar um novo ciclo catalítico.

Legenda:

- ▼ Droga; Ⓞ ATP; Ⓜ ADP+Pi; ⚡ Energia; = Membrana plasmática;
- Sítio de ligação de ATP com alta afinidade; ● Sítio de ligação de ATP com baixa afinidade;
- Sítio de ligação a drogas com alta afinidade; ■ Sítio de ligação a drogas com baixa afinidade.

1.4. A proteína ABCG2

A proteína ABCG2 é composta por 655 aminoácidos, tem peso molecular de 72,1 kDa e consiste numa proteína de membrana com um sítio de ligação a nucleotídeos N-terminal e uma região transmembranar C-terminal, composta de seis domínios transmembranares. Como os outros membros da subfamília ABCG, a proteína ABCG2 é classificada como um hemitransportador, que forma um homodímero para ser funcional (LITMAN *et al.*, 2001), apesar de terem sido descritos tetrâmeros (MCDEVITT *et al.*, 2006) e até dodecâmeros (XU *et al.*, 2004). Enquanto outros hemitransportadores estão presentes em membranas intracelulares, como é o caso dos transportadores para apresentação de antígenos 1 e 2 (TOWNSEND & TROWSDALE, 1993), a ABCG2 se localiza principalmente na membrana plasmática (Litman *et al.*, 2000), onde atua na expulsão de drogas do interior celular.

Os três primeiros grupos que descreveram o transportador ABCG2 deram a ele três nomes diferentes. Foram eles BCRP (do inglês, “Breast Cancer Resistance Protein”), por ter sido possível isolá-lo de uma sublinhagem de câncer de mama MCF-7 resistente (DOYLE *et al.*, 1998), ABCP, por ser um transportador ABC altamente expresso na placenta (ALLIKMETS *et al.*, 1998) ou MXR (do inglês, “Mitoxantrone resistance protein”), por ter sido identificado em células de carcinoma de cólon resistentes a mitoxantrona (MIYAKE *et al.*, 1999). A proteína foi identificada como a explicação para o fenótipo de resistência a múltiplas drogas em linhagens de células resistentes a drogas que não expressavam P-gp ou MRP1, que eram as proteínas associadas à resistência a drogas conhecidas naquele momento. O Comitê de Nomenclatura de Genes Humanos deu a esta proteína o nome

oficial de ABCG2, descrevendo-a como o segundo membro da subfamília ABCG de humanos.

Apesar de ter sido primeiramente descrito como tendo um papel na resistência de células cancerosas a quimioterápicos, este transportador também é encontrado em tecidos normais. Seu papel está bastante relacionado à proteção contra xenobióticos, como sugerem os altos níveis de expressão observados na placenta, participando da barreira materno-fetal. (ALLIKMETS *et al.*, 1998). Além disso, para a placenta, foi sugerido que este transportador poderia participar no transporte de hormônios esteróides ali produzidos, como a estrona 3-sulfato e dehidroepiandrosterona-sulfato (SUZUKI *et al.*, 2003). Um outro papel atribuído a ele seria a participação na formação da barreira hemato-encefálica, participando, juntamente com a P-gp e MRP1, da proteção contra a entrada de substâncias nocivas, devido a sua localização luminal na superfície do endotélio de microvasos presentes no cérebro (COORAY *et al.*, 2002). Sua expressão no trato gastrointestinal também indica uma participação em limitar a absorção de drogas e toxinas (JONKER *et al.*, 2000; Van HERWAARDEN *et al.*, 2003). Esta proteína também foi descrita como capaz de participar do efluxo de heme e porfirinas de células como eritrócitos e células tronco, protegendo-as contra o acúmulo excessivo de heme (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2007), bem como da secreção de riboflavina (vitamina B₂) no leite de camundongos, indicando que esta vitamina seria um possível substrato fisiológico para este transportador (VAN HERWAAREN *et al.*, 2007). Este último dado corrobora o fato de que o nível de expressão deste transportador em glândulas mamárias é bastante alto durante a lactação, levando também à concentração de drogas e xenotoxinas carcinogênicas no leite (JONKER *et al.*, 2005). Os animais com o gene *ABCG2* deletado são férteis e não apresentam alterações fenotípicas aparentes quando comparados

com animais selvagens, porém são extremamente sensíveis ao feoforbídeo A, uma porfirina fototóxica que é produto catabólico da clorofila (JONKER *et al.*, 2002).

No câncer, o maior número de resultados da participação deste transportador ocorre para a leucemia mielóide aguda (ROSS *et al.*, 2000; VAN DER KOLK *et al.*, 2002), entretanto, também existem relatos da presença deste transportador em tumores de diferentes origens (DIESTRA e colaboradores, 2002).

As divergências percebidas quanto à capacidade de transporte desta proteína em diferentes trabalhos, que traziam resultados contraditórios, levou a maiores investigações quanto à diferença de sequência destes transportadores em diferentes linhagens celulares. Isto acontecia em casos em que era relatada uma disparidade no transporte de rodamina 123 (HONJO *et al.*, 2001), e, assim, descobriu-se que variações no aminoácido presente na posição 482 eram cruciais para os vários padrões de transporte observados. A arginina nesta posição é considerada o resíduo presente na proteína selvagem, pois é encontrado nas linhagens celulares parentais e em células recentemente selecionadas com drogas, enquanto que, em linhagens celulares antigas selecionadas com drogas, pode haver uma substituição da arginina por uma glicina, uma treonina ou outros resíduos. Estas mudanças, portanto, são capazes de alterar a capacidade de ligação de diferentes drogas à proteína, o que pode levar a diferentes substratos transportados (OZVEGY-LACZKA *et al.*, 2005). Além deste resíduo, já existem outros descritos como responsáveis pela ligação a drogas, como E446, N557 e H630 (MIWA *et al.*, 2003). Recentemente, foi demonstrado que cada dímero de ABCG2 apresenta pelo menos dois sítios de ligação a droga simétricos (CLARK *et al.*, 2006). Além disso, mais de 40 SNPs (do inglês, “Single Nucleotide Polymorphisms”) foram descritos para o gene *ABCG2* (STAUD & PAVEK, 2005; YANESE *et al.*, 2005) e estas variações genótípicas determinam diferentes graus de susceptibilidade a drogas.

A atividade ATPásica da ABCG2 pode ser modulada de formas diferentes por diversas drogas. Ela é sensível a vanadato e observa-se uma atividade basal, talvez pela presença de algum substrato endógeno. Entre seus ativadores, estão a mitoxantrona, daunorubicina, prazosina e flavopiridol, o que confirma o fato de serem substratos da proteína. O composto de transporte FTC (fumitremorgina C) é um excelente inibidor da atividade ATPásica da ABCG2, enquanto que o verapamil, que é um inibidor do transporte, mas um ativador para a atividade ATPásica da P-gp, é um fraco inibidor da atividade ATPásica da ABCG2. E, ao contrário, a FTC é um bom ativador da atividade ATPásica da P-gp (LITMAN *et al.*, 2001).

1.4.1. Substratos e inibidores para ABCG2

De uma forma geral, os substratos transportados por esta proteína são moléculas grandes e hidrofóbicas, podendo ser positiva ou negativamente carregadas (POLGAR, ROBEY & BATES, 2008). Conforme citado anteriormente, muitos trabalhos já descreveram sua capacidade de transportar drogas utilizadas na quimioterapia anticâncer, que foram os primeiros substratos descritos, como flavopiridol, metotrexato, e inibidores de topoisomerase I (SCHELLENS *et al.*, 2000; ROBEY *et al.*, 2001; Volk & Schneider, 2003). Em seguida, compostos de outras classes foram identificados como substratos, tais como antibióticos (MERINO *et al.*, 2005; MERINO *et al.*, 2006), flavonóides (YODIM *et al.*, 2004; SESINK *et al.*, 2005), porfirinas (ROBEY *et al.*, 2006), entre outros. Recentemente, foi relatada para os inibidores de tirosina cinase, imatinibe e gefitinibe, a capacidade de serem

transportados pela ABCG2, sendo eles também descritos como inibidores competitivos da proteína (ELKIND *et al.*, 2005; BURGER *et al.*, 2004; YANESE *et al.*, 2004).

É importante mencionar também que ABCG2 compartilha diversos substratos com MRP1 e a P-gp, o que é o caso do GF120918 (DE BRUIN *et al.*, 1999), também chamado de elacridar, e da fumitremorgina C (FTC) – uma micotoxina produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* – e seu análogo Ko143 (RABINDRAN *et al.*, 2000; ALLEN *et al.*, 2002).

Neste mesmo caso incluem-se novos inibidores relatados recentemente para ABCG2, que são potentes e específicos para este transportador, que foram obtidos a partir de inibidores anteriormente descritos para P-gp. É o caso de alguns compostos obtidos a partir do tariquidar (KÜHNLE *et al.*, 2009) e de algumas chalconas, que foram obtidas a partir de um estudo anterior para P-gp (HAN *et al.*, 2008; LIU, TEE & GO, 2008).

1.5. Resistência a múltiplas drogas em *Saccharomyces cerevisiae*

Nos fungos, as duas maiores classes de transportadores envolvidos na resistência a múltiplas drogas são os transportadores ABC e membros da família MFS, que apresentam doze domínios transmembranares e utilizam como energia para o transporte a força próton motriz (LAGE, 2003).

Duas diferentes análises do genoma da levedura *S. cerevisiae* revelaram a presença de 29 (DECOTTIGNIES & GOFFEAU, 1997) ou 30 (TAGLICHT & MICHAELIS, 1998) “Open Reading Frames” (ORFs) de possíveis proteínas ABC. Destes, até a presente data, apenas

cinco já tiveram função relacionada à resistência a múltiplas drogas, que são Pdr5p, Snq2p, Pdr12p, Yor1p e Ycfp1, sendo que os três primeiros apresentam topologia [NBD-TMS₆]₂, ou seja, uma topologia invertida (BALZI *et al.*, 1994; BISSINGER & KUCHLER, 1994), quando comparada com a topologia da P-gp.

Dois genes, PDR1 e PDR3, codificam fatores de transcrição pertencentes à família Zn₂Cys₆, que regulam a expressão dos genes PDR5, SNQ2 e YOR1 (DECCOTIGNIES *et al.*, 2001). Mutações do tipo “ganho de função” conferem a esses fatores de transcrição a capacidade de induzir a superexpressão das proteínas Pdr5p, Snq2p e Yor1p em membranas plasmáticas. De forma geral, a expressão dos transportadores ABC em *S. cerevisiae* está sob o controle de uma complexa rede de regulação que envolve, além dos fatores de transcrição Pdr1p e Pdr3p, outros fatores reguladores da resposta ao stress (KOLACZKOWSKA & GOFFEAU, 1999).

Já foi observada uma sobreposição na capacidade de transporte de substratos dos produtos dos genes PDR5, SNQ2 e YOR1. Isto é observado em casos em que a sensibilidade total de uma cepa a um determinado composto só é obtida quando se faz dupla ou tripla deleção desses genes (KOLACZKOWSKI *et al.*, 1998). Para algumas drogas, as cepas deletadas em PDR1 e PDR3 são mais sensíveis que as cepas deletadas nos três genes de transportadores ABC, indicando que possam existir outros genes regulados por Pdr1p e Pdr3p, além dos genes estudados envolvidos na resistência a múltiplas drogas em leveduras.

O papel fisiológico desses transportadores ainda não está bem definido, mas foi sugerido por MAMNUN, SCHÜLLER & KUCHLER (2004) uma função para a Pdr5p no efluxo de produtos de catabolismo na fase de crescimento exponencial da levedura *S. cerevisiae*.

Os níveis de expressão deste transportador caem significativamente quando o crescimento celular começa a diminuir e a atividade do mesmo também é reduzida pela baixa da quantidade de glucose e nitrogênio presente no meio. Mais um dado interessante foi relatado por WOLFGER, MAMNUN E KUCHLER em 2004. Os autores descrevem o funcionamento de um outro transportador, a Pdr15p, que se torna mais abundante quando a célula começa a deixar a fase exponencial e que é induzido em diversas situações de estresse, como “heat shock”, baixa de pH, entre outros, e apresenta capacidade de transporte moderada de substâncias como cloranfenicol e detergentes.

Um transportador de *S. cerevisiae*, que apresenta função bem definida, é o produto do gene STE6, que apresenta grande homologia com a P-gp de mamíferos e com os transportadores da família PDR. Esta proteína não está envolvida no transporte de drogas, mas sim no efluxo do feromônio sexual **a** (KUCHLER *et al.*, 1989). Mais recentemente, HLAVÁČEK e colaboradores (2009) sugeriram um papel dos transportadores Pdr5p e Snq2p influenciando nas fases de desenvolvimento e fisiologia da população de leveduras crescendo em meio líquido. Esses dados, em associação, levariam a crer que estas proteínas estariam envolvidas no fenômeno de “quorum sensing”.

1.6. A proteína Pdr5p

A Pdr5p é um transportador da superfamília ABC que apresenta alta massa molecular (~160 kDa) e topologia invertida ([NBD-TMS₆]₂). Seu gene foi inicialmente identificado como sendo capaz de conferir resistência a cicloheximida, sulfometilurona e outras drogas, quando amplificada por um plasmídio multicópias (LEPPERT *et al.*, 1990).

A atividade ATPásica da Pdr5p já foi explorada em diversos trabalhos (DECOTTIGNIES *et al.*, 1994; DECOTTIGNIES *et al.*, 1998; GOLIN *et al.*, 2007) e sabemos que, em muitos aspectos, sua enzimologia se parece com a de outros transportadores ABC. Esta enzima apresenta *K_m* para a atividade ATPásica de 1,9 mM a 35°C, é magnésio-dependente e sua atividade ATPásica é totalmente extinta na presença de 300 µM de vanadato (GOLIN *et al.*, 2007). Porém, é necessário destacar que este transportador apresenta uma alta atividade ATPásica basal, o que sugere que possa haver um substrato presente *in vivo*, como um lipídio, peptídeo ou proteína anfipática, que estaria presente mesmo em preparações de membranas plasmáticas (ERNST *et al.*, 2008).

Em estudos com mutantes que superexpressam a Pdr5p, foi demonstrado que esta é capaz de hidrolisar outros nucleotídeos trifosfatados além do ATP, como o UTP, apresentando os melhores níveis de atividade ATPásica e UTPásica em pH 7,5 (DECOTTIGNIES *et al.*, 1994). GOLIN e colaboradores (2007) demonstraram que o GTP pode ter um papel importante como substrato fisiológico da Pdr5p em *S. cerevisiae*, uma vez que o *K_m* para atividade GTPásica desta proteína nessas leveduras está de acordo com as concentrações intracelulares deste nucleotídeo. Além disso, neste trabalho, os autores sugerem que o nucleotídeo trifosfatado utilizado pode variar de acordo com o substrato a ser transportado.

ERNST e colaboradores (2008) demonstraram que a Pdr5p apresenta uma atividade ATPásica basal e desacoplada do transporte de substratos, já que a mesma não é estimulada na presença destes. Em alguns casos a atividade ATPásica pode ser inibida pelo substrato, como ocorre para o clotrimazol. Neste caso, a atividade ATPásica é totalmente inibida em concentrações em que o composto continua sendo transportado pela proteína, enquanto que

as atividades GTPásica e UTPásica são mantidas. A proposta de GOLIN e colaboradores (2007) é que, de acordo com o substrato a ser transportado e as mudanças conformacionais que ele promove na proteína, o nucleotídeo trifosfatado a ser utilizado para o transporte pode variar, o que poderia ser uma forma de aumentar o número de substratos transportados, variando o nucleotídeo utilizado. Entretanto, no transporte de rodamina 6G, uma sonda fluorescente hidrofóbica, o único nucleotídeo trifosfatado capaz de promover o processo é o ATP, o que poderia indicar que, apesar de ser capaz de hidrolisar todo tipo de nucleotídeo trifosfatado (ATP, UTP, GTP, CTP, ITP) em velocidades comparáveis, apenas o ATP seria capaz de interagir adequadamente com o sítio de ligação a droga, induzindo a mudança de conformação necessária para o transporte do substrato (KOLACZKOWSKI *et al.*, 1996).

Muito estudo foi dedicado sem que ainda se possa confirmar a localização precisa e o número de sítios de ligação a drogas dos transportadores ABC em geral. Para a Pdr5p, uma proteína que confere resistência a diversas substâncias em *S. cerevisiae*, inicialmente, WOLFGER e colaboradores (2001) indicaram que a região de ligação a drogas estaria localizada nos segmentos transmembranares, uma vez que mutações pontuais nestes segmentos geraram mutantes com a especificidade alterada pelo substrato (droga). Desses mutantes produzidos, o que foi considerado mais interessante apresentava uma mutação S1360F (a troca de um aminoácido serina na posição 1360 por uma fenilalanina) no segmento transmembranar de número 10 (TMS10), que conferia especificidade diminuída por cetoconazol, bem como uma mínima resistência a itraconazol e cicloheximida. Além disso, a proteína mutante deixava de ser susceptível ao inibidor FK506 (também conhecido como tacrolimus), que inibe o transporte de certas drogas. Entretanto, se a troca do aminoácido serina fosse por uma alanina em vez de uma fenilalanina, ocorria um aumento

na sensibilidade da proteína ao inibidor (EGNER *et al.*, 1998). Isto poderia sugerir que o TMS10 controla tanto a especificidade de alguns substratos, quanto à susceptibilidade a alguns inibidores.

Em 2003, GOLIN e colaboradores propuseram a existência de pelo menos três sítios de ligação a drogas na Pdr5p. Estes diferem em comportamento com o modelo proposto para a P-gp, no que diz respeito ao tipo de interação entre os substratos e seus sítios de ligação, podendo alguns substratos interagir com mais de um sítio, o que indica uma sobreposição entre os mesmos. Além disso, foi demonstrado que, apesar de a ionização dos substratos não ser necessária para que ocorra o transporte, como sugerido anteriormente (GOLIN *et al.*, 2000), e de ter sido postulado que apenas um dos sítios utilize interações hidrofóbicas como forma de seleção para a ligação de substratos, existe uma dependência de tamanho (200-225 Å) para que ocorra o transporte em todos os sítios de ligação a substratos descritos para essa proteína.

1.6.1. Substratos e moduladores da Pdr5p

Inicialmente, a Pdr5p era vista como um análogo da P-gp de mamíferos (KOLACZKOWSKI *et al.*, 1996) e, como a P-gp, a Pdr5p apresenta múltiplos sítios de transporte, característica compartilhada com outros transportadores com quem tem grande homologia (SHUKLA *et al.*, 2003). Porém, GOLIN e colaboradores (2007) demonstraram que as regras para a afinidade por substratos diferem entre esses dois transportadores. Por exemplo, os compostos orgânicos contendo estanho são transportados pela Pdr5p, e não

pela P-gp (GOLIN *et al.*, 2003). Substratos que são compartilhados pelos dois transportadores são quimicamente complexos (KOLACZKOWSKI *et al., et al.*, 1996) e é bastante plausível que cada um seja capaz de reconhecer o substrato por uma característica diferente do mesmo. Da mesma forma, mesmo havendo uma sobreposição na capacidade de transporte dos três principais transportadores ABC de *S. cerevisiae*, para a Pdr5p existe uma restrição quanto ao tamanho do substrato a ser transportado que parece não existir para os outros dois. Por exemplo, Snq2p é capaz de transportar compostos que são muito pequenos para Pdr5p, como óxido de 4-nitroquinolina e resazurina (ROGERS *et al.*, 2001; LEONARD *et al.*, 1994).

Já foi demonstrado que a Pdr5p compartilha diversos substratos com a P-gp, entre eles, drogas utilizadas na quimioterapia anticâncer, peptídeos ionóforos e esteróides (KOLACZKOWSKI *et al.*, 1996). Além disso, a Pdr5p é capaz de conferir resistência a diversos azóis, polienos, herbicidas, além de outras classes de drogas (KOLACZKOWSKI *et al.*, 1998), com espectros que se sobrepõem aos de outros transportadores ABC de *S. cerevisiae* (Snq2p e Yor1p, por exemplo). No entanto, a Pdr5p é o único transportador capaz de conferir resistência celular à cicloheximida, benomil, fluxilazol, nuarimal, fenapromil e sorafen (DECOTTIGNIES *et al.*, 2001).

Em alguns casos, a Pdr5p é capaz de conferir resistência *in vivo* a determinados compostos, que se apresentam como potentes inibidores da ligação de rodamina 6G, que, por sua vez, também é transportada em células intactas. Como exemplo, temos a oligomicina, que é um excelente inibidor da Pdr5p, apresentando um IC₅₀ próximo a 82 nM para o transporte de drogas, que não é capaz de inibir o crescimento das células (KOLACZKOWSKI *et al.*, 1996). O sítio de ligação da rodamina 6G na Pdr5p foi estudado por Ernst e colaboradores (2008), e esses autores demonstraram que mutações na alça H da

proteína (presente no NBD2) são capazes de afetar seletivamente o transporte desta molécula, sem afetar o transporte de outros substratos e a atividade ATPásica.

O inibidor FK506 também é substrato para a Pdr5p, conforme descrito por EGNER e colaboradores (2000). Esses autores demonstraram que as células que superexpressam esta enzima são mais resistentes a este composto que aquelas que não a expressam. A explicação para a inibição do transporte de substâncias fluorescentes por este composto estaria numa taxa de efluxo menor ou em uma maior afinidade do mesmo pelo sítio de ligação a drogas, quando comparado a outros substratos como a Rodamina 6G.

CONSEIL e colaboradores (2003) demonstraram que um derivado de estradiol, RU49953, apresentou grande poder de inibição da Pdr5p, com um IC₅₀ próximo a 0,083 µM para a ligação de rodamina 6G. Porém, a concentração necessária para a inibição da atividade NTPásica da proteína foi 400 vezes maior, indicando que a inibição (que foi caracterizada como competitiva) estaria ocorrendo no sítio de ligação a drogas, e não no sítio de ligação de nucleotídeos.

Como a P-gp e outros transportadores homólogos possuem uma região passível de fosforilação por proteínas cinases, foi proposto que esta região estaria envolvida no controle do efluxo de drogas, já que foi demonstrado que a P-gp era capaz de ser fosforilada tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e que inibidores de proteína cinase C (PKC) eram capazes de inibir tanto a fosforilação, quanto a atividade da P-gp. Entretanto, foram realizadas mutações em todos os resíduos passíveis de fosforilação da P-gp e não se observou alteração na resistência a drogas. Assim, CONSEIL e colaboradores (2001) demonstraram que inibidores de PKC, como derivados da estaurosporina, são capazes de se ligar diretamente a transportadores como P-gp, Pdr5p e *ltmdr1* (de *Leishmania tropica*). De

fato, a inibição do processo de efluxo de drogas afeta tanto a ligação de rodamina 6G, como a hidrólise de nucleotídeos de forma não competitiva, sugerindo que este efeito estaria relacionado a uma interferência na transdução de sinal entre a hidrólise do nucleotídeo e a interação com a droga, e não à inibição da fosforilação desta proteína, o que é compatível com os resultados obtidos para a P-gp.

CONSEIL e colaboradores (2000) descreveram também o efeito de diversos prenil-flavonóides sobre a Pdr5p. Nesse trabalho, observou-se que esta classe de inibidores da enzima em questão liga-se com alta afinidade à mesma. Este efeito foi correlacionado à capacidade de inibição da ligação de rodamina 6G ao(s) sítio(s) de ligação a drogas da proteína. Esta inibição se mostrou competitiva pelo sítio de ligação a drogas, o que foi confirmado pelo fato de que a hidrólise tanto de ATP como de UTP ocorreu em concentrações muito mais altas. Dos derivados de flavonóides testados, o que demonstrou ser mais eficiente foi a 6-(3,3-dimetilalil)-galangina, com uma constante de inibição (K_i) de $0,18\mu\text{M}$ para a ligação de rodamina 6G.

1.7. A busca pela reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas

Existem diversas estratégias de combate à resistência a múltiplas drogas. Todas elas envolvem diminuição do impacto causado pelo efluxo dos agentes quimioterápicos, tendo como objetivo manter uma alta concentração da droga no interior celular, para que esta atinja seu sítio de ação. A estratégia ideal seria a de encontrar novas classes de drogas que não fossem transportadas por bombas de efluxo (Figura 6, item A). O uso de inibidores

para transportadores de múltiplas drogas é uma outra possibilidade. Neste caso, que já foi amplamente explorado para o transportador ABC mais estudado até hoje, a P-gp (revisado por MCDEVITT & CALLGHAN, 2007), o acúmulo do quimioterápico seria restabelecido através do bloqueio da função dos transportadores responsáveis pela expulsão da droga. As diferentes possibilidades de inibição da função desses transportadores são mostradas nos itens B e C da Figura 6. O inibidor poderia agir somente sobre o transportador, bloqueando sua função (Figura 6, item B), ou alvejar mais de um alvo celular, sendo ao mesmo tempo capaz de matar a célula ou inibir seu crescimento, inibir a função das bombas de efluxo envolvidas no fenótipo de resistência desta célula e também inibir a transcrição ou tradução dessas proteínas (Figura 6, item C), atuando, por exemplo, sobre fatores de transcrição da família da proteína Pdr1p, encontrada em fungos como *C. glabrata* e *S. cerevisiae*, cujo mecanismo, via um receptor nuclear, é semelhante àquele descrito para a proteína PXR (do inglês, “Pregnane X Receptor”), envolvido na regulação dos genes MDR de humanos (THAKUR *et al.*, 2008). Uma outra estratégia seria a de depletar a energia requerida para as células realizarem o efluxo de drogas (Figura 6, item D), através da inibição, por exemplo, da enzima Pma1p, uma H⁺-ATPase, para o caso de fungos. Esta estratégia se mostra interessante, pois, em geral, a perda da função de um determinado transportador de drogas leva a uma maior expressão de outros, produzindo um efeito compensatório (KOLACZKOWSKA *et al.*, 2008), e dessa forma todos os transportadores seriam inibidos por um mesmo mecanismo. Finalmente, novas drogas poderiam ser desenhadas com a capacidade de serem captadas de forma mais eficiente pela célula (Figura 6, item E), ou seja, o influxo seria maior que o efluxo, levando a um balanço positivo para a captação da droga, sem qualquer regulação do efluxo (CANNON *et al.*, 2009).

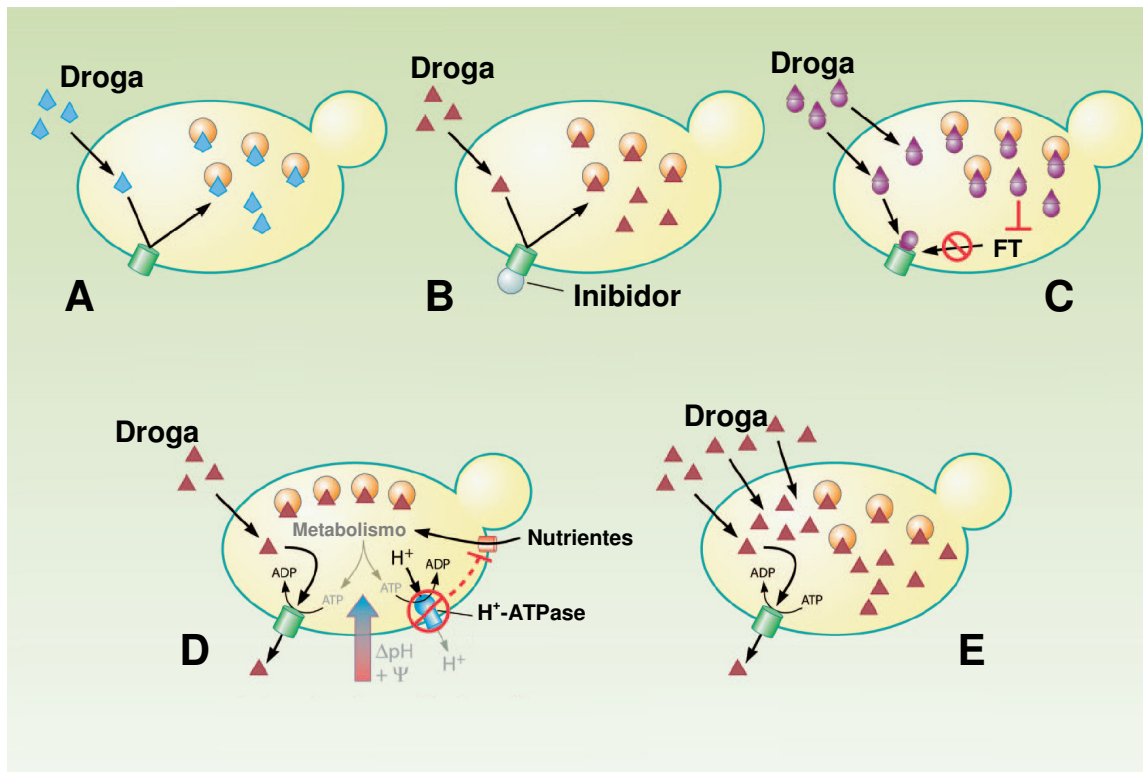


Figura 6. Estratégias para superar a resistência a múltiplas drogas (Adaptado de CANNON *et al.*, 2009). (A) Célula susceptível a uma droga que não é substrato para as bombas de efluxo, ou que é rapidamente fungicida. (B) a droga é administrada em combinação com inibidor para a bomba. (C) A droga é um inibidor multifuncional e afeta ao mesmo tempo seu alvo, a atividade da bomba de efluxo e a transcrição do transportador. (D) A droga é administrada em combinação com um inibidor da enzima responsável pelo potencial de membrana, neste caso, a uma bomba de prótons, levando à redução da captação de nutrientes e, conseqüentemente, a concentração de ATP, o pH e o potencial de membrana. (E) a captação da droga é aumentada e supera o efluxo. (FT) fator de transcrição.

1.7.1. Derivados do ácido gálico e classes de chalconas na resistência a múltiplas drogas

Os derivados do ácido gálico já tiveram diversas atividades biológicas descritas, como inibição da P-gp (KITAGAWA *et al.*, 2005), atividade antiproliferativa e indutora de apoptose para células de leucemia humana HL-60 (DODO *et al.*, 2008), ação citotóxica para diferentes linhagens de tumores de camundongos (FREY *et al.*, 2006) e também atividades antibacteriana (KUBO, FUJITA & NIHEI, 2003; TÖRMAKÄNGAS *et al.*, 2005) e antiviral (UOZAKI *et al.*, 2007, HURTADO *et al.*, 2008; KRATZ *et al.*, 2008), entre outras. Das atividades apresentadas por esses compostos, a atividade antifúngica (KUBO, XIAO & FUJITA, 2001; LEAL *et al.*, 2009), e a antioxidante (MASAKI *et al.*, 1997) são as mais exploradas, uma vez que esses compostos, sobretudo os galatos de propila, octila e dodecila, por apresentarem essas propriedades, são utilizados como aditivos em alimentos (KUBO *et al.*, 2002).

As chalconas são bioprecursores dos flavonóides e apresentam uma estrutura básica de 1,3-difenilprop -2- en-1-ona (Figura 7). Diversos grupos já descreveram atividades biológicas para essa classe de compostos como agentes anticâncer (LIU & GO, 2006; TATSUZAKI *et al.*, 2003), antimaláricos (LIU *et al.*, 2001), entre outras. O uso desses compostos como inibidores de proteínas de resistência a múltiplas drogas foi relatado por BOIS e colaboradores, em 1998 (4-alcoxichalconas) para a P-gp e em 1999, para chalconas halogenadas. IVANOVA e colaboradores, em 2008, descreveram o efeito de 3,4,5-trimetoxichalconas também como inibidores da P-gp e LIU, TEE & GO (2008) demonstraram que substituições no anel A com grupos 5-(1-etilpiperidina-4-ila) e 2,4-

dimetoxi aumentaram o poder inibitório desses compostos. Ao verificar a especificidade desses compostos para a P-gp, os autores verificaram que apenas um composto da série testada era capaz de inibir ABCG2. Esta descoberta deu origem a um novo trabalho, em que são descritas chalconas com substituições 2,4-dimetoxi ou 2,4-dihidroxi como inibidores específicos de ABCG2, por não apresentarem efeito sobre a P-gp (HAN *et al.*, 2008).

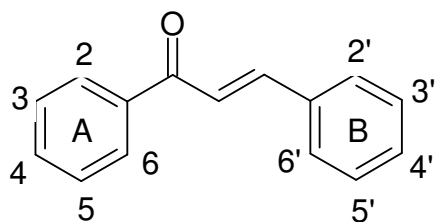
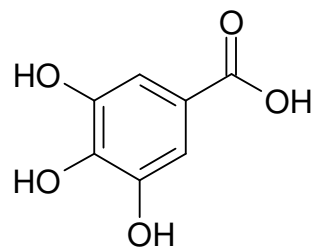
A**B**

Figura 7. Estrutura básica dos compostos utilizados neste trabalho. (A), Estrutura básica de uma chalcona, (B), Estrutura do ácido gálico. A lista completa dos compostos utilizados neste trabalho pode ser encontrada em “Materiais e Métodos”.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho, procuramos estudar duas diferentes classes de compostos, os derivados do ácido gálico e as chalconas, cuja estrutura básica é mostrada na Figura 7, com relação a seu potencial como inibidores de dois transportadores ABC, a Pdr5p de *S. cerevisiae* e a ABCG2 humana, envolvida na resistência a múltiplas drogas no câncer, explorando o mecanismo de inibição dessas enzimas. Os compostos utilizados neste trabalho estão listados em “Materiais e Métodos”. Sendo assim, os objetivos específicos desta tese são:

- Verificar o efeito de ésteres do ácido gálico e de novos derivados de chalconas sobre o transporte de substratos da Pdr5p de *S. cerevisiae* e sobre a ABCG2 de humanos;
- Verificar o efeito desses compostos sobre a atividade NTPásica das duas proteínas;
- Verificar a capacidade de reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas por esses compostos;
- Aprofundar o entendimento do mecanismo de inibição por esses compostos, através do estudo do tipo de inibição promovido pelos mesmos.

Parte dos resultados desta tese, referente aos efeitos dos derivados do ácido gálico sobre a Pdr5p, originaram um trabalho, submetido à revista canadense “Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences”, que se encontra no Anexo I.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

A mitoxantrona, calceína-AM, ATP, UTP, benzonase, liticase, aprotinina, AEBSF, DTT, MTT e a rodamina 6G foram comprados da Sigma®, o composto GF120918 foi adquirido da GlaxoSmithKline®, o composto FK506 foi adquirido da Tecoland Corporation (EUA). Todos os outros reagentes utilizados nesta tese apresentavam alto grau de pureza. Os derivados do ácido gálico e as chalconas utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidos pelo grupo do Prof. Ricardo José Nunes (Universidade Federal de Santa Catarina) e estão listados na Figura 8 (para os derivados do ácido gálico) e nas Tabelas I, II e III, para as três séries de chalconas.

3.2. Crescimento da cepa de *S. cerevisiae* AD1234567

As cepas de *S. cerevisiae* AD1234567 (Δ yor1::hisG, Δ snq2::hisG, Δ pdr5::hisG, Δ pdr10::hisG, Δ pdr11::hisG, Δ ycf1::hisG, Δ pdr3::hisG), deletada de todos os transportadores ABC da levedura expressos na fase exponencial de crescimento, uma vez que não há deleção para Pdr15p, que é expresso somente na fase estacionária, e AD124567 (Δ yor1::hisG, Δ snq2::hisG, Δ pdr10::hisG, Δ pdr11::hisG, Δ ycf1::hisG,

AG = Ácido gálico $R_1=R_2=R_3=R_4=OH$

G2 = Galato de etila $R_1=R_2=R_3=OH$; $R_4=OCH_2CH_3$

G4 = Galato de butila $R_1=R_2=R_3=OH$; $R_4=O(CH_2)_3CH_3$

G6 = Galato de hexila $R_1=R_2=R_3=OH$; $R_4=O(CH_2)_5CH_3$

G8 = Galato de octila $R_1=R_2=R_3=OH$; $R_4=O(CH_2)_7CH_3$

G10 = Galato de decila $R_1=R_2=R_3=OH$; $R_4=O(CH_2)_9CH_3$

G12 = Galato de dodecila $R_1=R_2=R_3=OH$; $R_4=O(CH_2)_{11}CH_3$

G16 = Galato de hexadecila $R_1=R_2=R_3=OH$; $R_4=O(CH_2)_{15}CH_3$

G18 = Galato de octadecila $R_1=R_2=R_3=OH$; $R_4=O(CH_2)_{17}CH_3$

G10M = 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila $R_1=R_2=R_3=OCH_3$; $R_4=O(CH_2)_9CH_3$

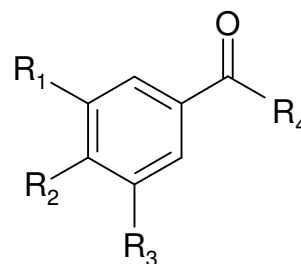


Figura 8. Derivados de ácido gálico utilizados neste trabalho.

Tabela I. Chalconas da Série L – derivados da 3,4-metilenodioxi-acetofenona.

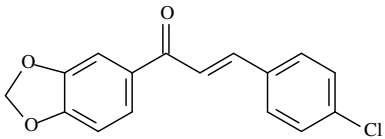
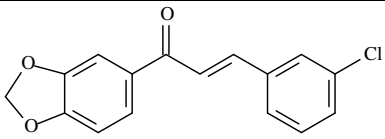
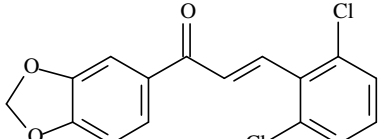
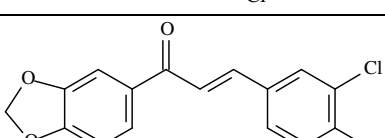
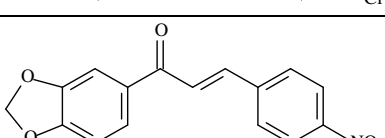
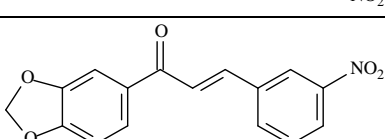
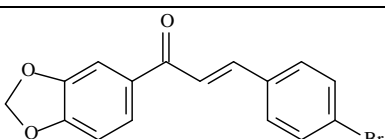
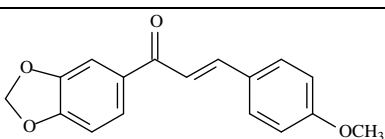
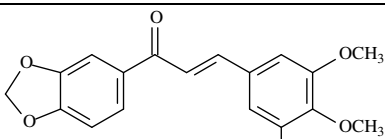
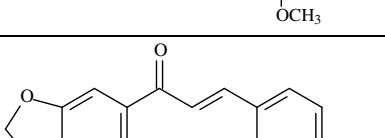
Composto	Estrutura	Massa Molecular
L1		286,71
L2		286,71
L3		321,16
L4		321,16
L5		297,27
L6		297,27
L7		331,17
L8		282,3
L11		342,35
L13		266,3

Tabela I. Continuação

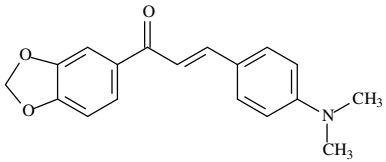
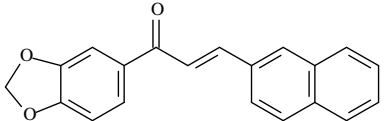
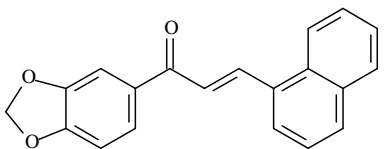
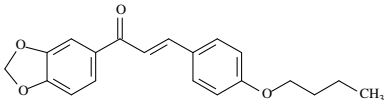
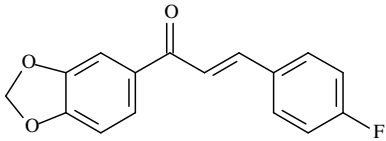
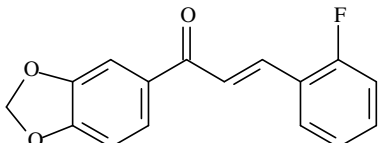
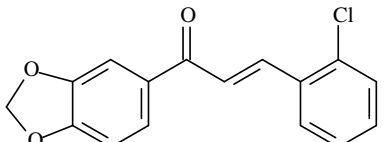
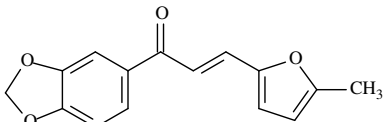
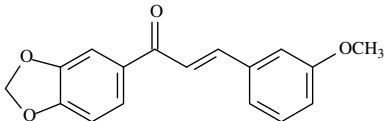
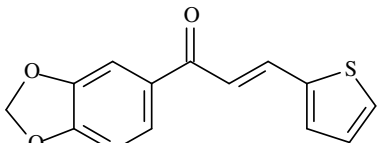
Composto	Estrutura	Massa Molecular
L14		295,34
L15		302,33
L16		302,33
L18		324,38
L19		270,26
L20		270,26
L23		286,71
L24		256,26
L25		282,3
L27		258,29

Tabela I. Continuação

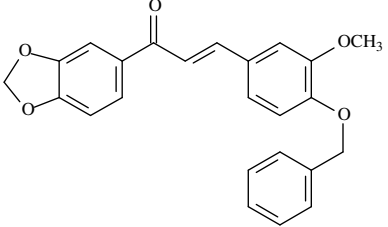
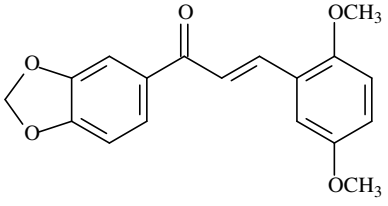
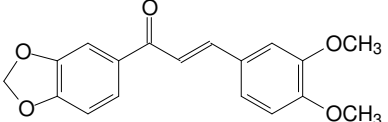
Composto	Estrutura	Massa Molecular
L28		388,24
L29		312,32
L38		312,32

Tabela II. Chalconas da Série R – derivados da 2-naftilacetofenona.

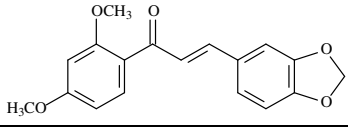
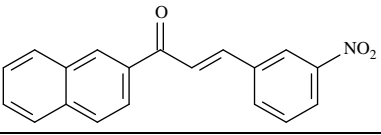
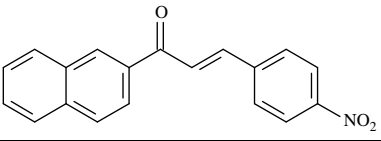
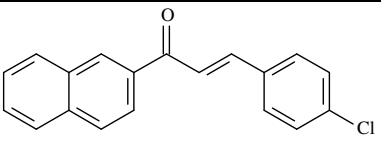
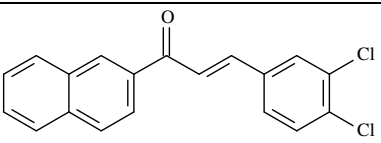
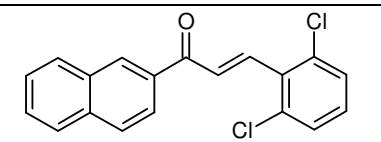
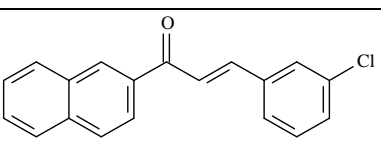
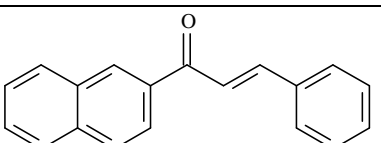
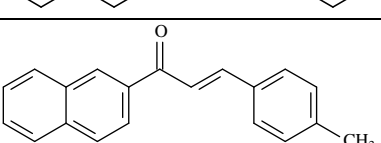
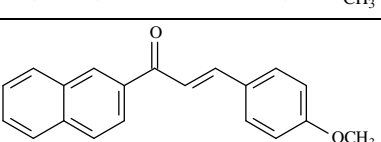
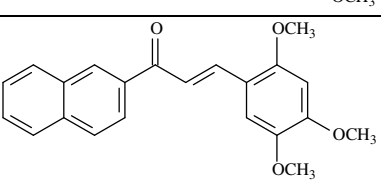
Composto	Estrutura	Massa Molecular
R5		312,32
R7		303,32
R8		303,32
R10		292,76
R11		327,21
R12		327,21
R13		292,76
R15		258,32
R16		272,35
R17		288,35
R20		348,40

Tabela II. Continuação

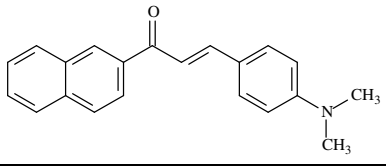
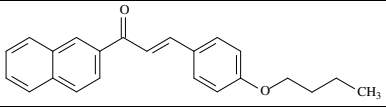
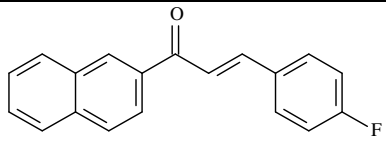
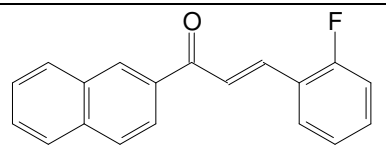
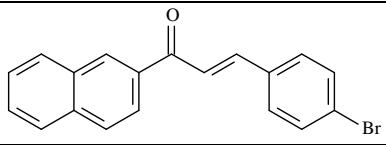
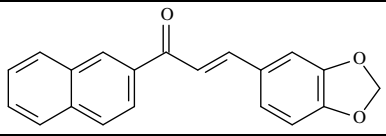
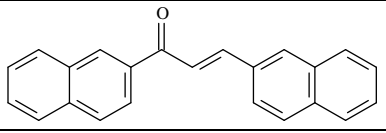
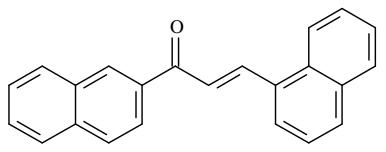
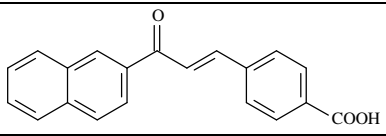
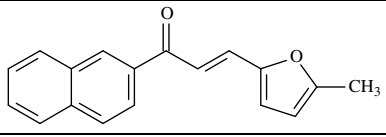
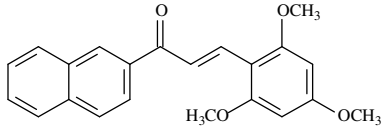
Composto	Estrutura	Massa Molecular
R21		301,39
R23		330,43
R24		276,31
R25		276,31
R26		337,22
R27		302,33
R28		308,38
R29		308,38
R32		302,33
R36		262,31
R44		348,4

Tabela II. Continuação

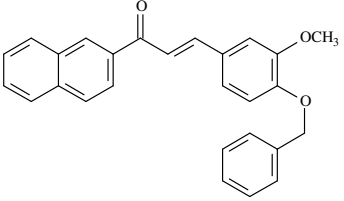
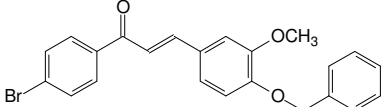
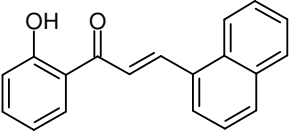
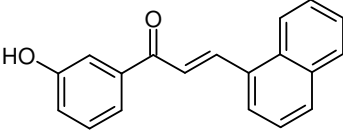
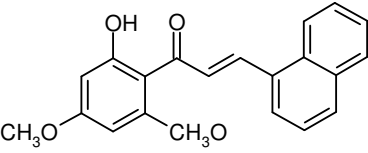
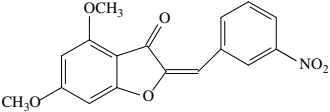
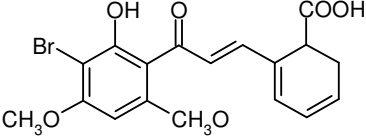
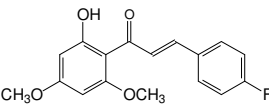
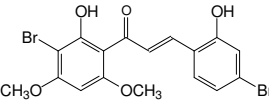
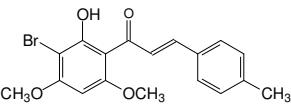
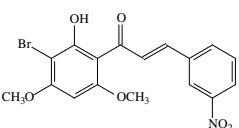
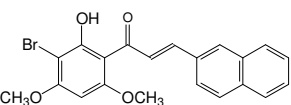
Composto	Estrutura	Massa Molecular
R45		394,47
R46		423,31

Tabela III. Chalconas da Série H – Hidroxichalconas

Composto	Estrutura	Massa Molecular
H16		274,32
HA4		274,32
HA32		334,37
HAU		327
HB1		407,22
HB62		302,30
HB68		458,10
HB74		377,30
HB75		408,21
HB85		413,27

Δ pdr3::hisG) (DECOTTIGNIES *et al.*, 1998), que superexpressa o gene PDR5, foram crescidas em meio de cultura YPD (extrato de levedura 1 %, peptona 2 %, e dextrose 2 %) por aproximadamente 17 h, até uma leitura da densidade ótica correspondente à metade da fase de crescimento exponencial.

3.3. Isolamento de membranas plasmáticas de *S. cerevisiae*

O isolamento das membranas plasmáticas foi feito como descrito por GOFFEAU E DUFOUR (1988), com algumas modificações feitas pelo nosso grupo (RANGEL *et al.*, 2008). Após o crescimento, as células foram lavadas com solução de azida sódica a 10 mM e mantidas em gelo. Estas sofreram digestão química da parede celular a 37°C por 1 h com liticase, na proporção de 0,025 mg de enzima para cada unidade de densidade ótica obtida após o crescimento. Em seguida, após utilização de um homogeneizador do tipo “potter”, a fração mitocondrial foi eliminada por centrifugação a 9000 $\times g$ durante 30 minutos e a fração bruta de membranas plasmáticas foi isolada por centrifugação a 20000 $\times g$ por 45 minutos. As alíquotas obtidas foram armazenadas a -70°C em tampão Tris-EGTA 1 mM pH 7,5 e na presença de um coquetel de inibidores de proteases. A medida da concentração de proteínas foi realizada pelo método descrito por BRADFORD (1976), utilizando albumina bovina (BSA) como solução padrão.

3.4. Medida da atividade NTPásica da Pdr5p

A atividade ATPásica foi medida pela incubação de aproximadamente 13,0 µg/ml de proteína a 37°C em um volume final de 50 µl na presença de um meio de reação padrão contendo ATP 3 mM, MgCl₂ 4 mM e Tris-HCl 100 mM ajustado para pH 7,5, além dos inibidores enzimáticos (para outras ATPases e/ou fosfatases de membrana) azida sódica 7,5 mM, molibdato de amônio 0,3 mM e KNO₃ 75 mM. A reação, realizada em microplacas de 96 poços, num volume final de 50 µl, era disparada pela adição das membranas plasmáticas e paralisada após 60 minutos pela adição de 100 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (p/v) seguindo o método descrito por DULLEY (1965). O fosfato inorgânico liberado pela hidrólise do ATP foi medido de acordo com o método descrito por FISKE & SUBBAROW (1925), com a adição de 100 µl por poço do reagente. Este era composto de uma parte de uma solução redutora misturada a cinco partes de uma solução de molibdato de amônio 10 g/l em ácido sulfúrico 1% (v/v). A solução redutora foi preparada com 2,5 g de bissulfito de sódio e 1,25 g de ANSA em 12,5 ml de água destilada, misturados a 500 ml de uma solução a 15% (p/v) de metabissulfito de sódio. Esta mistura, que compõe o redutor de fiske, foi mantida por 24 h em geladeira protegida da luz e em seguida filtrada para a remoção dos cristais violeta formados. Após 15 minutos, a leitura das placas foi feita utilizando um leitor de microplacas (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Alemanha) a 660 nm.

Neste meio também eram adicionados os compostos a serem testados, em concentrações diferentes (discriminadas nas legendas das figuras), dependendo do experimento a ser realizado.

3.5. Efluxo de rodamina 6G por células intactas de *S. cerevisiae*

Os experimentos de avaliação de efluxo foram feitos como descrito anteriormente por NIIMI e colaboradores (2004), com pequenas modificações. As células das cepas AD124567 e AD1234567 foram crescidas em meio YPD até antes da metade da fase exponencial e então lavadas em água destilada e mantidas a 4°C em tampão HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,0. No dia seguinte, elas foram ressuspensas para uma D.O. de 10 e incubadas com 2-deoxiglicose a 30°C por 30 minutos e em seguida com rodamina 6G a 15 µM. Após 30 minutos a 30°C, as células foram lavadas duas vezes, ressuspensas novamente em tampão HEPES para uma D.O. de 10 e divididas em alíquotas de 200 µl. As alíquotas foram incubadas por 1 h a 30°C com ou sem os compostos a serem testados e foi adicionada glicose na concentração final de 0,2 % para disparar a reação de efluxo. Uma série de tubos controle foi realizada utilizando tampão HEPES no lugar da glicose para descontar da série com glicose. As amostras foram então centrifugadas a 9000 ×g por 5 minutos e o sobrenadante foi recolhido para quantificação fluorimétrica em um leitor de microplacas (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Alemanha), utilizando comprimento de onda de excitação de 529 nm e o de emissão de 553 nm.

3.6. Análise qualitativa do acúmulo de Rodamina 6G por microscopia de fluorescência

Este ensaio foi realizado como descrito por YAMAMOTO e colaboradores (2005). As células das cepas AD12345678 e AD1345678 foram crescidas em meio YPD até a metade da fase exponencial a 30°C “overnight”, tratadas com ou sem os compostos a serem testados e cultivadas por 2 h a 30°C. Em seguida, foi adicionada Rodamina 6G para uma concentração final de 2 µM. Após 30 minutos, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS contendo 2 % de glicose e visualizadas em um microscópio de fluorescência Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha).

3.7. Cultura de células HEK-293

As células da linhagem HEK-293 (do inglês, “Human Embryonic Kidney”) transfectadas com o plasmídeo *pcDNA3* e os genes *ABCG2*, *ABCB1* ou *ABCC1*, ou com o vetor vazio, foram cultivadas até aproximadamente 90 % de confluência em meio DMEM (Gibco), acrescidas de 10 % de soro fetal bovino, 1 % de penicilina/estreptomicina e suplementadas com 500 µg/ml de G418 (Gibco), também conhecido como geneticina, utilizado para selecionar células transformadas geneticamente com o vetor *pcDNA3*.

3.8. Citometria de fluxo

Para avaliar a capacidade inibitória dos compostos testados neste trabalho sobre a ABCG2, utilizamos a técnica de citometria de fluxo para medir a indução do acúmulo de substâncias fluorescentes, que são substratos para os transportadores estudados, no interior celular, por esses compostos, verificando a inibição dessas proteínas. Dessa forma, em placas de 24 poços, um total de 2×10^5 células da linhagem HEK-293 *pcDNA3ABCG2* ou HEK-293 *pcDNA3* foram expostas a 5 μM de mitoxantrona em DMEM por 30 minutos a 37°C na presença ou ausência dos compostos a serem testados, que foram diluídos em DMSO em uma concentração máxima de 0,5 %. Em seguida, o meio de cultura foi removido e foi adicionada uma nova quantidade de meio, livre de substrato e com a mesma concentração de composto. Após uma hora, o meio de reação foi novamente removido e as células foram destacadas com PBS, utilizando uma pipeta automática. A medida da fluorescência do substrato mitoxantrona (excitação a 635 nm) acumulada no seu interior foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur 4C HTS (Becton Dickinson Biosciences), equipado com um laser diodo vermelho, utilizando o canal FL4. Para os testes com as células HEK-293 *pcDNA3ABCC1*, no lugar de mitoxantrona, foi utilizado 1 μM de calceína-AM, sendo utilizado o canal FL1 para a leitura da fluorescência no citômetro de fluxo. A fluorescência dos compostos testados foi avaliada e células que não foram incubadas com qualquer substrato foram incluídas como controle para autofluorescência e não apresentaram interferência no resultado final do experimento. Os valores da média geométrica da fluorescência obtida referente ao acúmulo de mitoxantrona pelas células que superexpressam ABCG2 ou ABCB1 foram comparados com o valor

obtido na presença de 5 μ M de GF120918 (DE BRUIN *et al.*, 1999), que serviu como controle positivo. Para a linhagem que superexpressa MRP1, HEK-293 *pcDNA3ABCC1*, cujo substrato foi a calceína, os valores foram comparados com o valor obtido para o inibidor de referência MK571 a 30 μ M.

3.9. Preparação de Membranas de células HEK-293

As membranas foram obtidas segundo protocolo descrito por DEY e colaboradores (1998). As células cultivadas em meio DMEM, acrescido de 10 % de soro fetal bovino e 1 % de penicilina/ estreptomicina, até 80-90 % de confluência, foram removidas com a ajuda de PBS gelado acrescido de 1 % de aprotinina e recolhidas através de centrifugação por 10 minutos a 1000 \times g. O sedimento foi ressuscitado em 50 ml de um tampão de lise hipotônico (Tris 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 1 mM, aprotinina 1 %, AEBSF 2 mM, pH 7,5). A amostra foi congelada a -70°C e lentamente descongelada em gelo. As células foram rompidas com um homogeneizador “dounce”, diluídas duas vezes em tampão de lise e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 500 \times g. O sobrenadante foi incubado com benzonase (50U/ ml) em CaCl₂ 1 mM por 20 minutos para digestão dos ácidos nucléicos das células lisadas, dispersos no sobrenadante. Após centrifugação a 100000 \times g por 60 minutos a 4°C, o sedimento foi ressuscitado em tampão de ressuspensão (Tris 10 mM, glicerol 10 %, sacarose 250 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM aprotinina 1 %, AEBSF 2 mM, pH 7,5), aliqotado e armazenado a -70°C. A medida da concentração de proteínas foi

realizada pelo método descrito por BRADFORD (1976), utilizando albumina bovina (BSA) como solução padrão.

3.10. Atividade ATPásica da ABCG2

A atividade ATPásica da ABCG2 foi medida de acordo com o método de SARKADI *et al.* (1992) e o método para quantificação do Pi liberado foi inicialmente descrito por CHIFFLET *et al.* (1988). Membranas plasmáticas de células contendo ABCG2 foram utilizadas para disparar a reação em microplacas com um volume final de 60 µl, em um meio contendo KCl 50 mM, DTT 2 mM, 5mM, Tris-HCl 41,2 mM, pH 7,5, além dos inibidores EGTA 2 mM, ouabaína 1,3 mM e azida sódica 5 mM. Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços, onde foram adicionados de aproximadamente 10 µg de proteína, com ou sem a adição de ortovanadato de sódio a 400 µM. Os compostos foram adicionados a partir de soluções estoque em DMSO, cuja concentração máxima era de 0,5 %. A reação foi interrompida após 1 h de hidrólise pela adição de 30 µl de SDS 10 %. Em seguida, foram adicionados 200 µl de reagente de detecção de Pi (5 ml de molibdato de amônio a 35 mM em solução de acetato de zinco a 15 mM, pH 5,0, misturados com 20 ml de ácido ascórbico 10 %) e após 20 minutos foi medida a absorbância a 660 nm em um leitor de microplacas (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Alemanha). A diferença de atividade ATPásica na presença ou ausência de vanadato de sódio, no meio que continha EGTA, ouabaína e azida sódica como inibidores para outras ATPases corresponde à atividade ATPásica da ABCG2.

3.11. Ensaios de citotoxicidade

As células HEK-293 *pcDNA3ABCG2* e as células contendo o vetor vazio HEK-293 *pcDNA3* foram cultivadas como descrito anteriormente e destacadas com tripsina. Em seguida, foram dispostas em placas de 96 poços (5000 células por 200 µl por poço). As células foram incubadas por 24 horas para que aderissem à placa. Os compostos foram adicionados com concentração final de DMSO máxima de 0,5 % e as células foram incubadas durante 72 horas, a 37°C com 5 % de CO₂. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio do MTT (MOSMANN, 1983). Para esses ensaios foram utilizadas concentrações crescentes dos compostos, até 100 µM, enquanto que para os ensaios de sensibilização à mitoxantrona por inibição da ABCG2, foram utilizadas concentrações crescentes da mitoxantrona (até 1µM) e uma concentração fixa dos compostos testados (1 µM), selecionadas de forma a que não fossem tóxicas para as células utilizadas a partir do experimento de citotoxicidade.

3.12. Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos resultados obtidos nesta tese foram realizadas através da utilização do programa Sigma Plot V. 10.0[®] (SPSS Science Marketing). O ajuste matemático das curvas de inibição e os valores de Ki aparente foram obtidos a partir da equação $f(x)=V_o/(1+(x/K_i))+R$, sendo $f(x)$ a velocidade enzimática correspondente a uma determinada concentração de inibidor, x a concentração de inibidor, V_o a velocidade enzimática

inicial (na ausência de inibidor), K_i a constante de inibição aparente e R o resíduo (fração da atividade enzimática insensível ao inibidor).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito dos derivados de ácido gálico sobre a atividade ATPásica da Pdr5p

A atividade ATPásica da Pdr5p foi testada frente a dez compostos diferentes desta série (Figura 9). Os derivados de ácido gálico testados neste trabalho apresentam substituições seja na cadeia lateral, transformando o grupamento ácido em éster e variando o tamanho desta cadeia, seja no anel fenólico, substituindo as hidroxilas por metoxilas. O que podemos observar na Figura 9 é que o efeito inibitório destes compostos a 100 μM sobre a Pdr5p é inexpressivo para o ácido gálico e seus derivados de cadeia lateral curta com até 8 carbonos. Porém, o efeito inibitório sobre a Pdr5p foi observado em compostos de cadeia lateral de tamanho médio, sendo a potência desses compostos aumentada até o tamanho de 12 carbonos. Em seguida, com a cadeia lateral contendo 16 carbonos, observamos a perda parcial na capacidade inibitória desses compostos. Além disso, podemos observar que o derivado de dez carbonos na cadeia lateral cujas hidroxilas do anel fenólico foram substituídas por metoxilas não apresentou qualquer efeito sobre a atividade ATPásica da proteína. Os ésteres que apresentaram efeito mais pronunciado na concentração testada foram o galato de decila e o galato de dodecila.

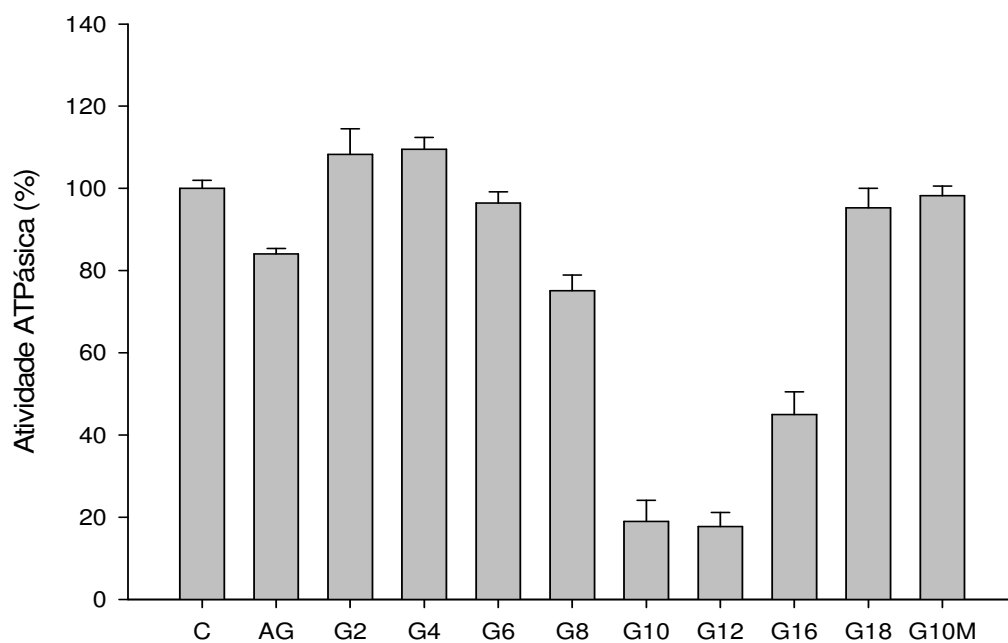


Figura 9. Atividade ATPásica da Pdr5p na presença dos diferentes derivados do ácido gálico. A atividade ATPásica foi ensaiada em preparações de membrana utilizando a concentração de 100 μ M dos derivados. Os valores representam a média \pm o erro padrão de 3 experimentos independentes. (C) controle. As siglas para os compostos estão listadas na Figura 8.

4.2. Inibição da atividade NTPásica da Pdr5p pelos galatos de decila e dodecila

Realizamos com dois compostos, selecionados por seu maior seu poder inibitório no experimento anterior, curvas de dose-resposta para a atividade ATPásica e UTPásica, com concentrações que foram até 200 μM . O que podemos observar nas Figuras 10 e 11 é que os dois compostos apresentaram perfis de curvas bastante parecidos, tanto para ATP como para UTP, com os valores de K_i aparente (constante de inibição) mostrados na Tabela IV. O ácido gálico e o 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila foram utilizados no experimento com ATP como controles negativos para a inibição da atividade ATPásica da enzima na faixa de concentrações testada, e por esse motivo, não avaliamos seu efeito sobre a atividade UTPásica, nem calculamos seus valores de K_i aparente.

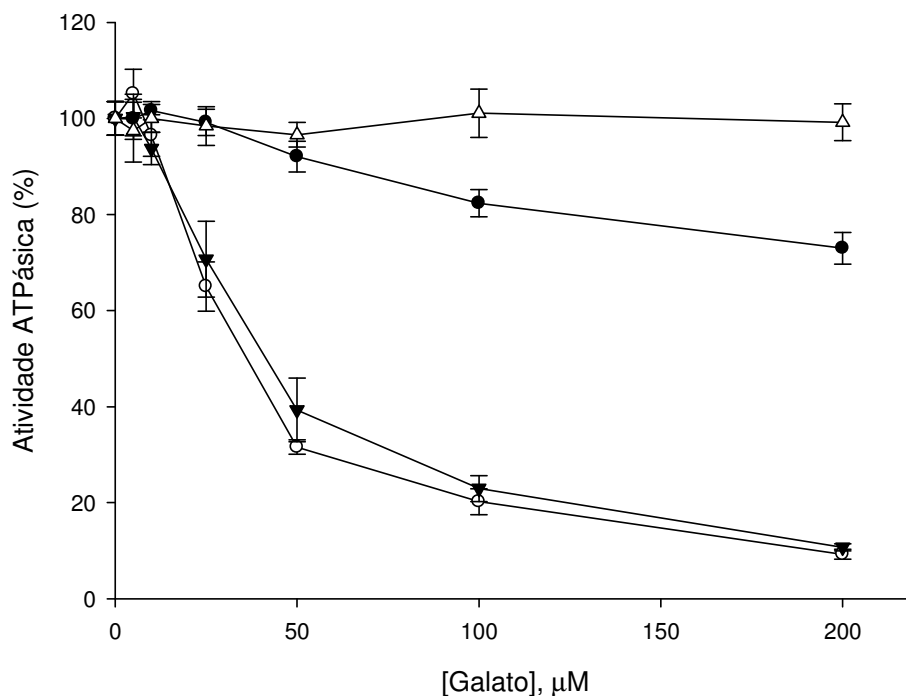


Figura 10. Curvas de inibição realizadas com os derivados do ácido gálico. Os galatos de decila (○) e dodecila (▼) foram utilizados e seus valores de K_i aparente foram calculados a partir do ajuste matemático das curvas, como descrito em “Materiais e Métodos”. O ácido gálico (●) e o 3,4,5- trimetoxibenzoato de decila (Δ) foram utilizados como controle negativo. As preparações de membranas foram incubadas em meio de reação padrão, com concentrações crescentes dos compostos, como descrito em “Materiais e Métodos”. A atividade máxima, correspondente ao ponto sem adição de inibidor (100%) era de $0,1727 \pm 0,006 \mu\text{Mol Pi. mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($n = 3 \pm \text{S.E.}$).

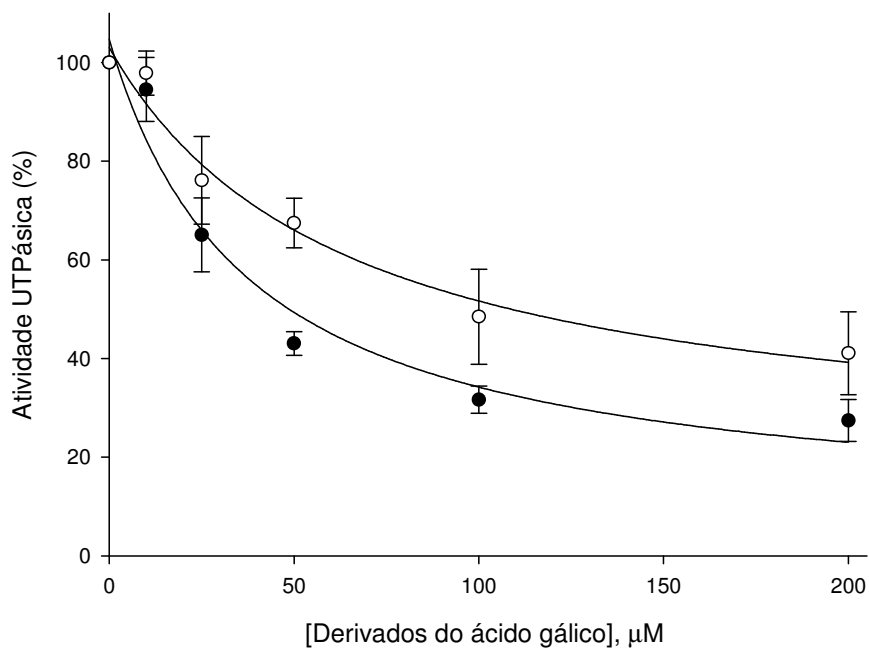


Figura 11. Curvas de inibição da atividade UTPásica da Pdr5p na presença dos galatos de decila e dodecila. Os galatos de decila (●) e dodecila (○) foram utilizados em concentrações crescentes até 200 μM . Os valores de K_i aparente foram calculados a partir do ajuste matemático das curvas, como descrito em “Materiais e Métodos”. A atividade máxima, correspondente ao ponto sem adição de inibidor (100%) era de $0,086 \pm 0,009 \mu\text{Mol Pi. mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ($n = 3 \pm \text{S.E.}$).

Tabela IV. Valores de K_i aparente para a inibição promovida pelos galatos de decila e dodecila utilizando ATP ou UTP como substrato

Substrato	Galato de decila	Galato de dodecila
ATP	$45,4 \pm 2,15 \mu\text{M}$	$55,3 \pm 1,97 \mu\text{M}$
UTP	$37,7 \pm 2,09\mu\text{M}$	$63,8 \pm 2,35 \mu\text{M}$

4.3. Tipo de inibição promovida pelos galatos de decila e dodecila sobre a atividade ATPásica da Pdr5p

Com o objetivo de investigar o tipo de inibição promovido pelos dois compostos selecionados sobre a atividade ATPásica da Pdr5p, nós avaliamos os graus de inibição desta enzima quando variamos a concentração de ATP (1 mM, 2 mM e 3 mM), na presença de concentrações diferentes destes inibidores (10, 20 ou 40 μ M) (Figura 12). Quando traçamos um gráfico duplo-recíproco, observamos um padrão de inibição do tipo competitiva, indicando que estes compostos realizariam sua inibição através da ligação ao domínio de ligação de nucleotídeos.

4.4. Efeito dos derivados de ácido gálico sobre o efluxo de rodamina 6G pela Pdr5p

Para efeitos de comparação, decidimos avaliar o efeito dos derivados de ácido gálico também sobre o efluxo de rodamina 6G realizado pela Pdr5p. A rodamina 6G é um substrato fluorescente da Pdr5p frequentemente usado para a avaliação de sua capacidade de transporte. Na Figura 13, observamos que, na presença de glicose, as células da cepa AD124567 foram capazes de promover o efluxo de rodamina 6G, cuja fluorescência foi detectada no sobrenadante (controle). Quando adicionamos os galatos utilizados neste trabalho, observamos um padrão bastante semelhante àquele observado para a atividade

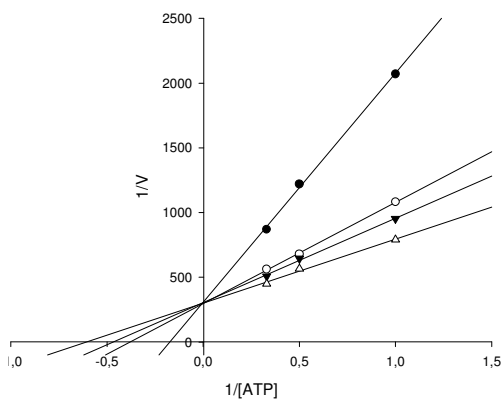
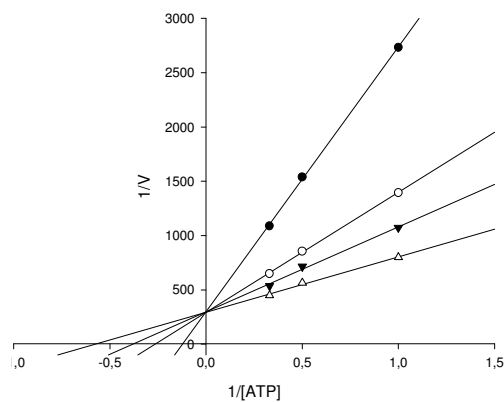
A**B**

Figura 12. Tipo de inibição da atividade ATPásica da Pdr5p pelos derivados de ácido gálico. Gráficos de duplo-recíproco da atividade ATPásica, sugestivo de uma inibição competitiva, com concentrações diferentes do substrato ATP: 1 mM, 2,0 mM e 3,0 mM, na ausência (●) ou na presença de concentrações dos dois galatos utilizados, sendo elas de 10 μM (○), 20 μM (▼) e 40 μM (△). **A**, galato de decila, **B**, galato de dodecila. Os dados mostrados se referem a um experimento típico.

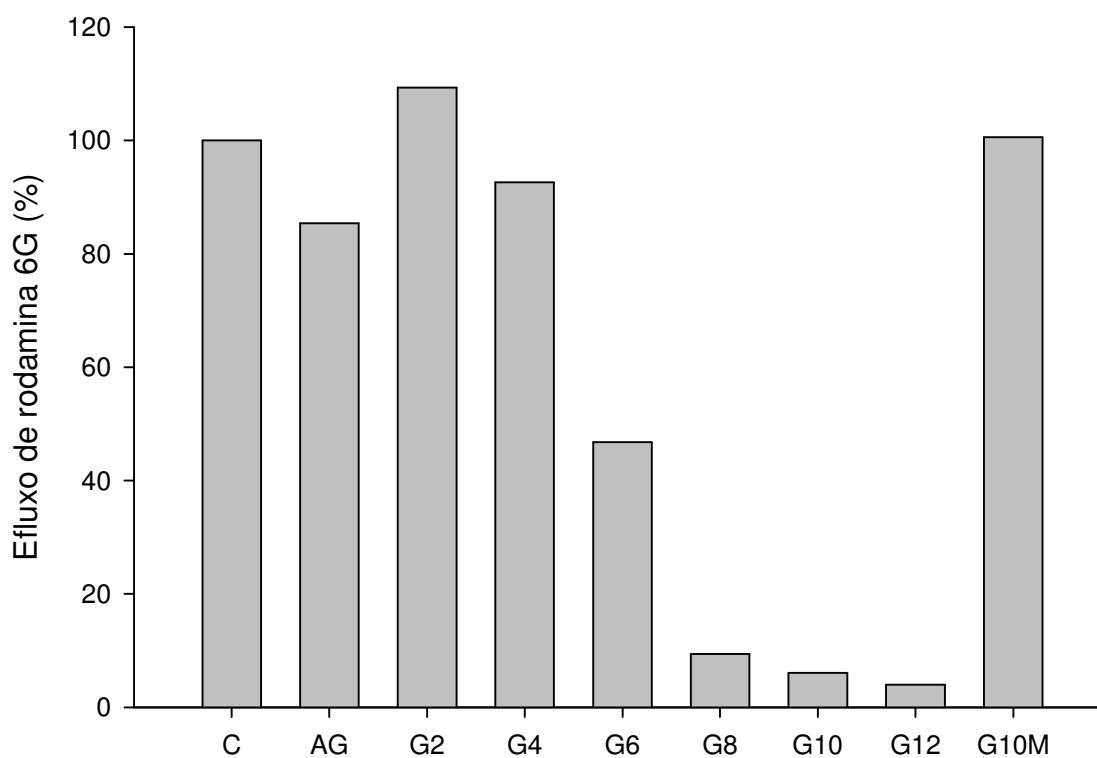


Figura 13. Efeito dos derivados do ácido gálico sobre o transporte de Rodamina 6G pela Pdr5p. Os compostos foram testados a uma concentração final de 100 μ M, utilizando meio padrão para medida do efluxo, como descrito em Materiais & Métodos. (C) controle. As siglas para os derivados são mostradas na Figura 8. Os dados correspondem a um experimento representativo.

ATPásica na mesma concentração utilizada no experimento inicial (100 μ M). Curvas de dose-resposta para os galatos de decila e dodecila mostraram valores de IC₅₀ 10 vezes menores do que aqueles obtidos para a atividade ATPásica (Figura 14).

Também foram realizadas microscopias de fluorescência utilizando a rodamina 6G como sonda fluorescente e os galatos de decila e dodecila a 25 μ M (Figura 15), uma concentração em que já se observa uma inibição razoável da atividade ATPásica. A microscopia confirma o resultado obtido para a medida da fluorescência em fluorímetro, ou seja, há um acúmulo de rodamina 6G no interior celular, em intensidade semelhante àquela observada para o inibidor de referência, o FK506 a 10 μ M, e para a cepa controle, AD1234567.

4.5. Efeito das diferentes séries de chalconas sobre o efluxo de rodamina 6G pela Pdr5p

Nesta seção, avaliamos o efeito de três diferentes séries de chalconas sobre o efluxo de rodamina 6G promovido pela Pdr5p.

Para a série L (Figura 16), que são chalconas derivadas da 3,4-metilenodioxiacetofenona, observamos que cinco dos compostos testados apresentaram um efeito inibitório da Pdr5p superior a 50 % na concentração de 100 μ M. Quando avaliamos a série R (Figura 17), de chalconas derivadas da 2-naftilacetofenona, obtivemos um número maior de compostos capazes de produzir um efeito inibitório do efluxo de rodamina 6G superior a 50 %, porém decidimos selecionar um único composto de cada série para dar continuidade

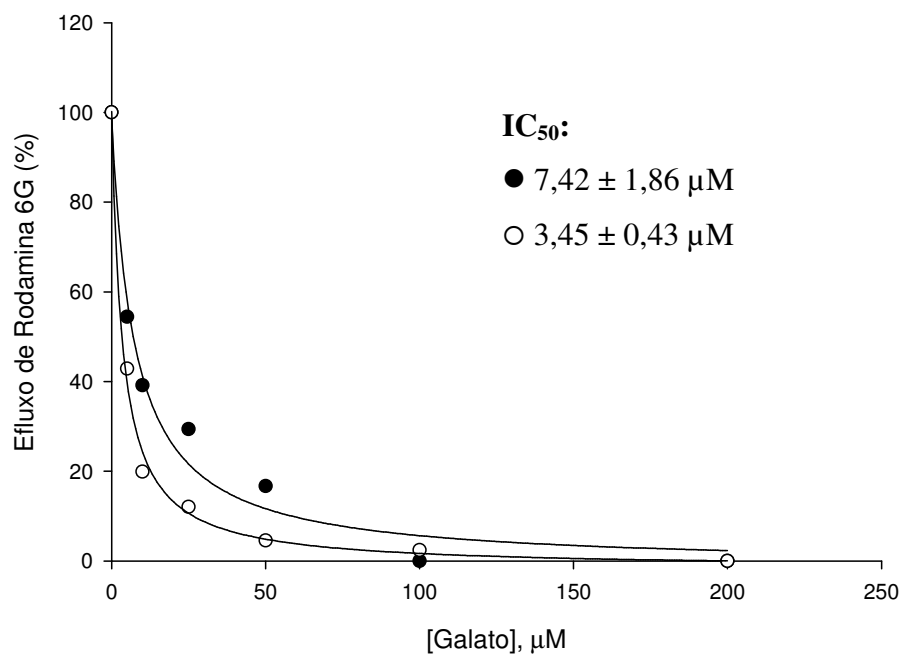


Figura 14. Curva de dose-resposta dos galatos de decila e dodecila sobre o transporte de Rodamina 6G pela Pdr5p, medido por fluorescência do sobrenadante. Os compostos foram testados em concentrações crescentes até 200 μM. (○) galato de decila, (●) galato de dodecila. Os dados correspondem a um experimento padrão, descrito em “Materiais & Métodos”.

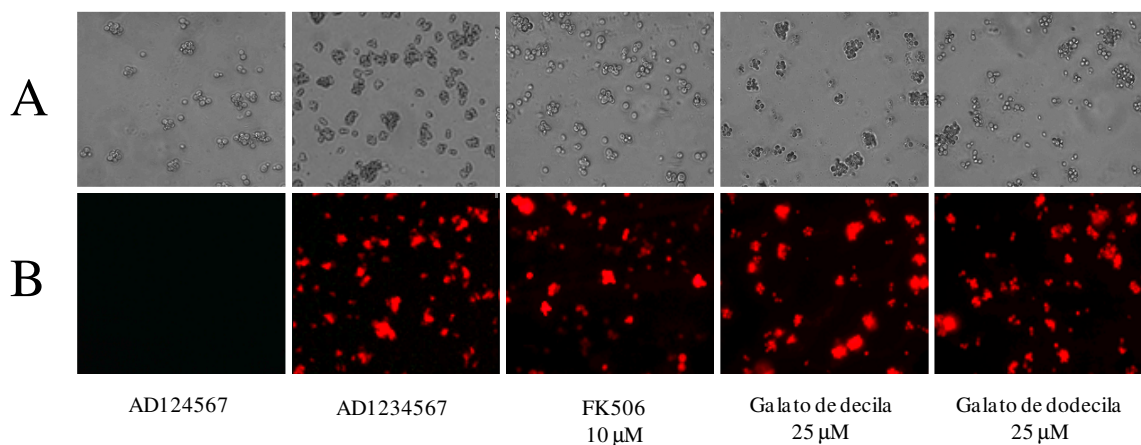


Figura 15. Efeito dos galatos de decila e dodecila sobre o transporte de rodamina 6G.

As células da cepa AD124567 foram incubadas com Rodamina 6G na presença ou ausência dos compostos testados a 25 μ M e do inibidor de referência FK506 a 10 μ M, como controle positivo. O acúmulo de Rodamina 6G é observado através do aumento da fluorescência intracelular. A cepa AD1234567 também foi utilizada como controle positivo. (A) contraste de fase, (B) fluorescência.

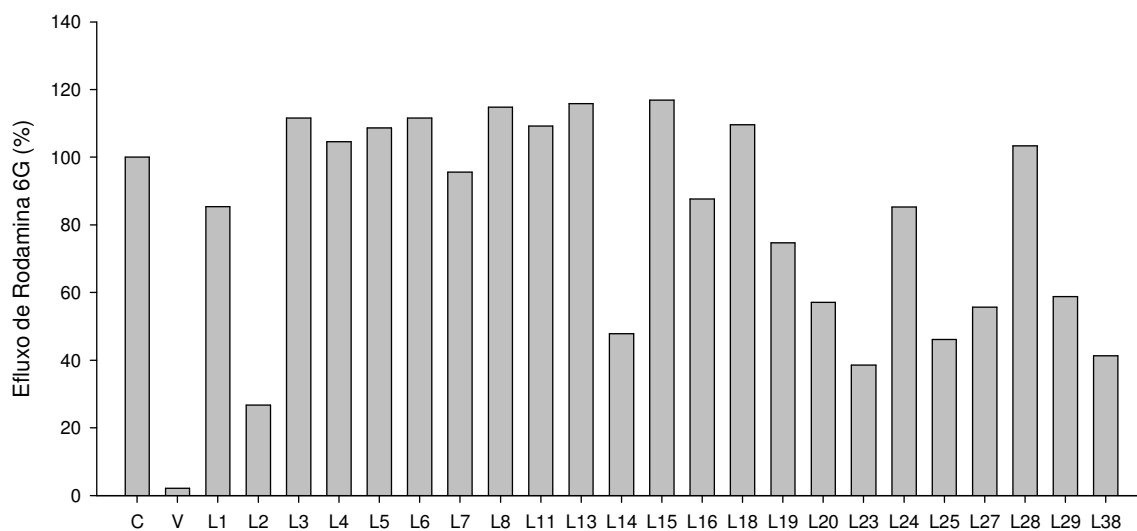


Figura 16. Efeito das chalconas da série L (derivados da 3,4-metilenodioxiacetofenona) sobre o efluxo de rodamina pela cepa AD124567. As células foram carregadas com 15 μM de rodamina 6G, como descrito em Materiais e Métodos. Todos os compostos foram testados em uma concentração fixa de 100 μM . Os resultados correspondem a um experimento típico. (C) controle, (V) cepa AD1234567.

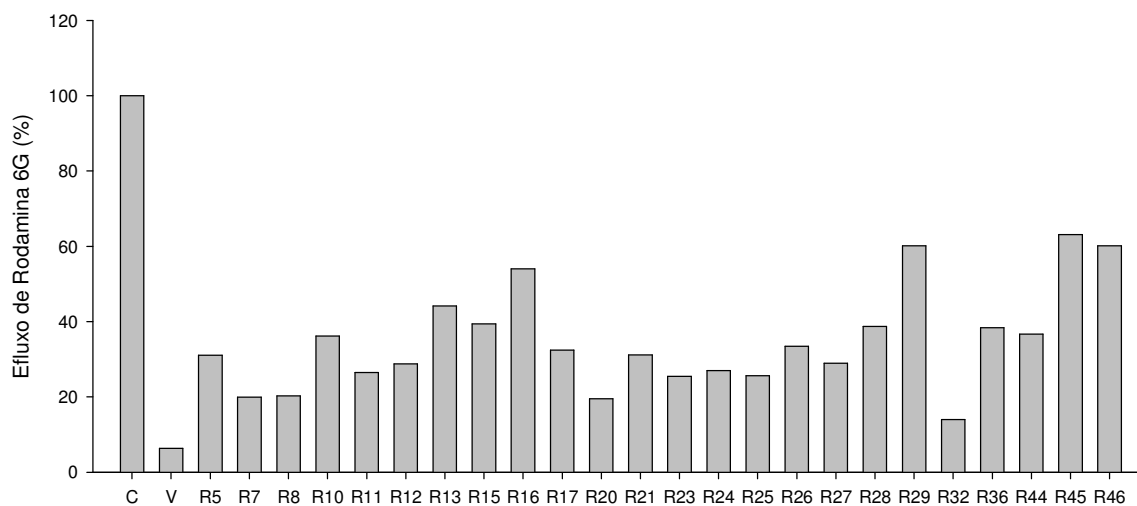


Figura 17. Efeito das chalconas da série R (derivadas da 2-naftilacetofenona) sobre o efluxo de rodamina pela cepa AD124567. As células foram previamente carregadas com 15 μ M de rodamina 6G, como descrito em Materiais e Métodos. Todos os compostos foram testados em uma concentração fixa de 100 μ M. Os resultados correspondem a um experimento padrão. (C) controle, (V) cepa AD1234567.

a este trabalho. Na Figura 18, foi testado o efeito de 100 μM das chalconas da série H, que são hidroxichalconas de estruturas variadas. Desta série, aquela que apresentou melhor resultado de inibição do efluxo de rodamina 6G pela Pdr5p foi a chalcona HA4, que chegou próximo a 90 % de inibição. Sendo assim, os compostos selecionados foram aqueles que apresentaram os melhores valores para a inibição do efluxo de cada série, ou seja, HA4, L2 e R32.

4.6. Inibição do efluxo de rodamina 6G pelas chalconas selecionadas das séries H, L e R

Os compostos selecionados de cada série foram utilizados para a realização de curvas de inibição, até 200 μM , que são mostradas na Figura 19 onde podemos observar curvas com perfis dose-dependentes.

Foi possível estimar, a partir do ajuste matemático das curvas de inibição, os valores de IC_{50} para esses compostos, como mencionado em “Materiais e Métodos”. Os valores de K_i aparente obtidos (em μM) foram de $28,72 \pm 8,82$ para HA4, $66,22 \pm 2,7$ para L2 e $40,8 \pm 6,09$ para R32.

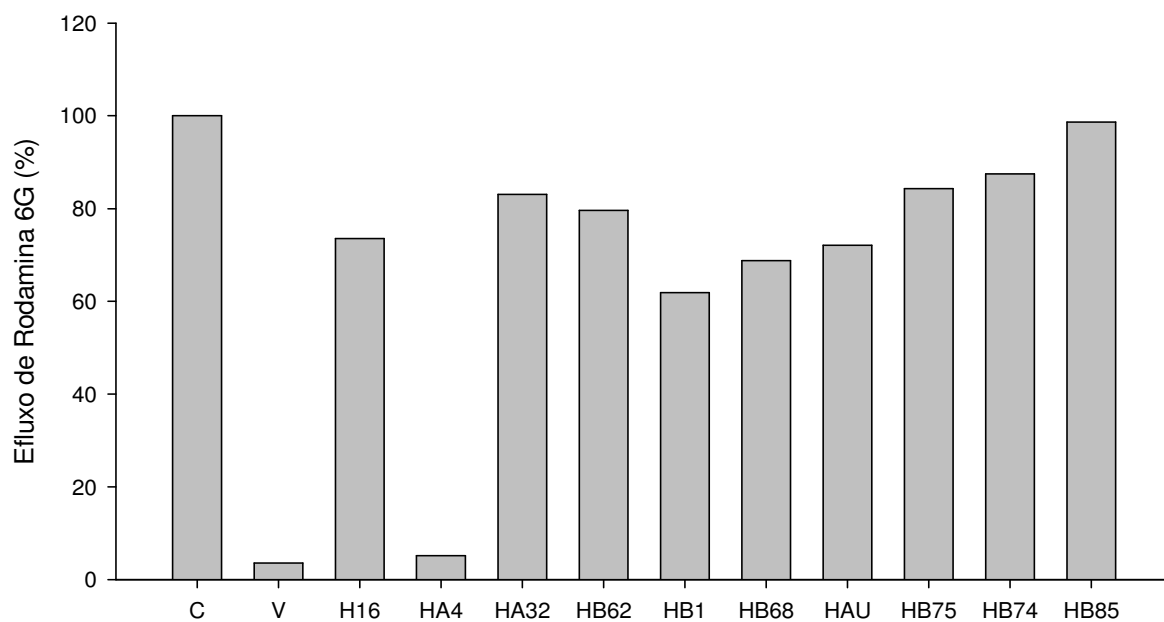


Figura 18. Efeito das chalconas da série H (hidroxichalconas) sobre o efluxo de rodamina pela cepa AD124567. As células foram carregadas com 15 μM de rodamina 6G, como descrito em Materiais e Métodos. Todos os compostos foram testados em uma concentração fixa de 100 μM . Os resultados correspondem a um experimento típico. (C) controle, (V) cepa AD1234567.

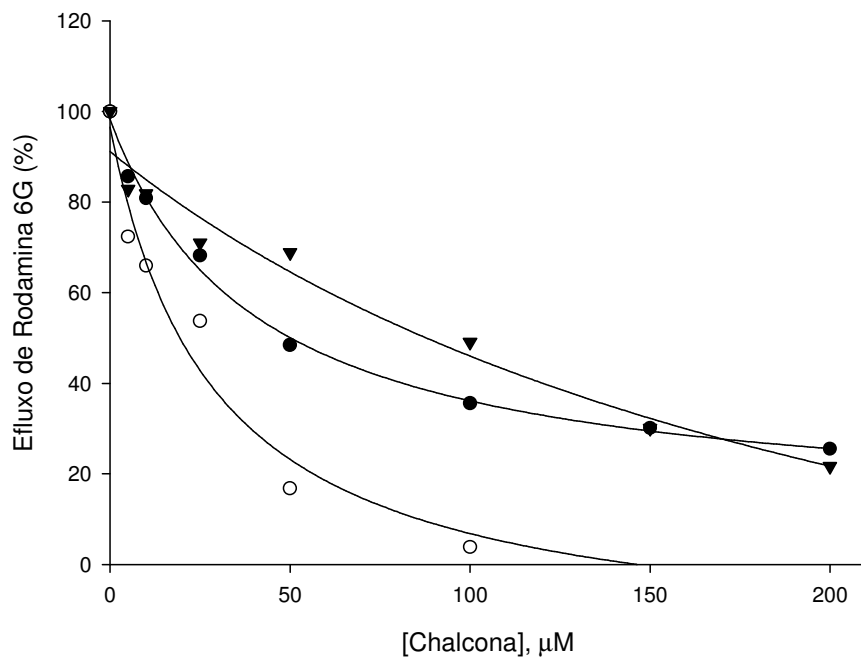


Figura 19. Curvas de dose-resposta com os compostos selecionados HA4 (○), R32 (●) e L2 (▼) sobre o efluxo de rodamina 6G pela cepa AD124567. As células foram incubadas com 15 μM de rodamina 6G, como descrito em Materiais e Métodos. As chalconas foram testadas em concentrações crescentes, até 200 μM. As curvas teóricas foram obtidas como descrito em “Materiais e Métodos”. Os resultados correspondem a um experimento típico.

4.7. Efeito das diferentes séries de chalconas sobre a atividade ATPásica da Pdr5p

Decidimos comparar o efeito de todas as chalconas sobre a atividade ATPásica da Pdr5p. Para isso, medimos a atividade ATPásica de preparações de membrana das células que superexpressam a Pdr5p (cepa AD124567) na presença das chalconas utilizadas neste trabalho na mesma concentração selecionada para a triagem inicial (100 μ M). Podemos observar nas Figuras 20, 21 e 22 que, para esta classe de inibidores, a inibição da atividade ATPásica não está relacionada com o transporte, e vice-versa, uma vez que as chalconas das três séries utilizadas produziram efeitos, em sua maioria, de ativação da proteína. O único composto que se mostrou inibidor da atividade ATPásica (R36) apresentou uma atividade mediana para a inibição do efluxo de rodamina 6G.

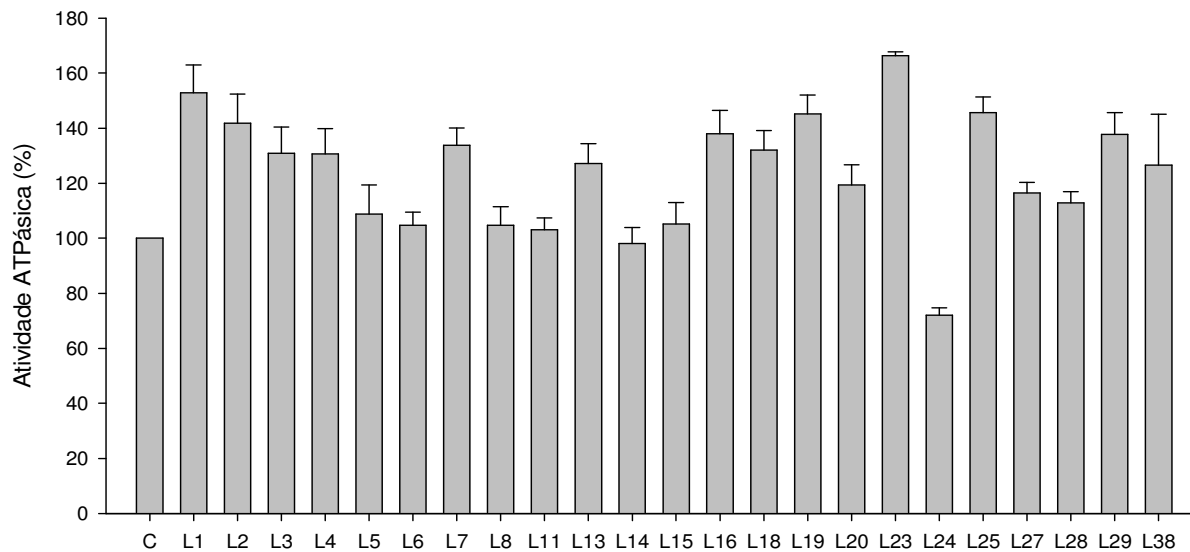


Figura 20. Efeito das chalconas da série L sobre a atividade ATPásica da Pdr5p de *S. cerevisiae*. A avaliação do efeito desses compostos frente à atividade ATPásica da preparação de membranas foi realizada como descrito anteriormente (ver “Materiais e Métodos”), com uma concentração fixa de 100 μ M. (C) Controle ($n = 3 \pm$ S.E.).

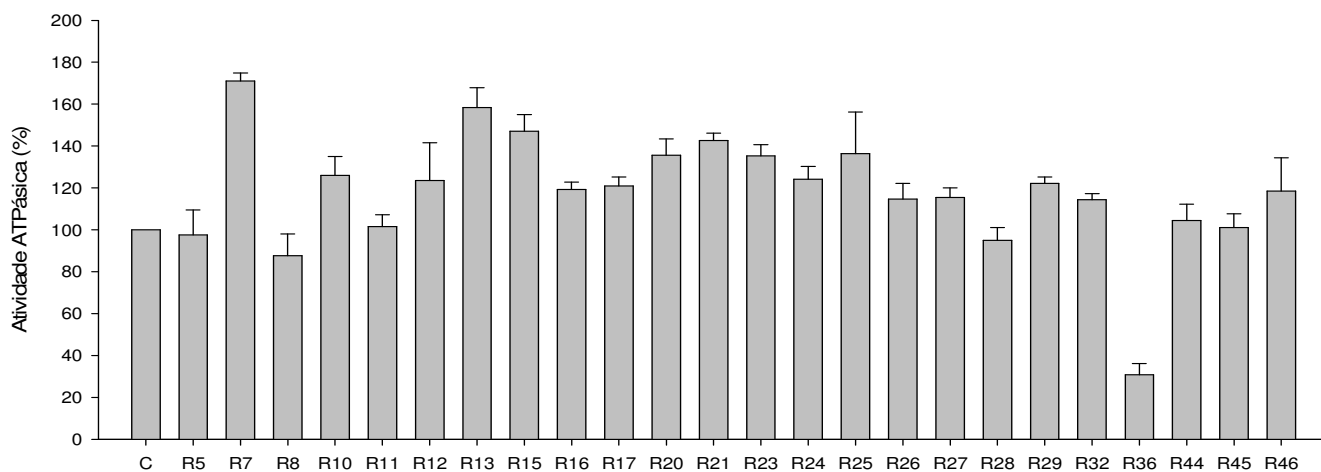


Figura 21. Efeito das chalconas da série R sobre a atividade ATPásica da Pdr5p de *S. cerevisiae*. A avaliação do efeito desses compostos frente à atividade ATPásica da preparação de membranas foi realizada como descrito anteriormente (vide “Materiais e Métodos”), com uma concentração fixa de 100 μ M ($n = 3 \pm$ S.E.). (C) Controle.

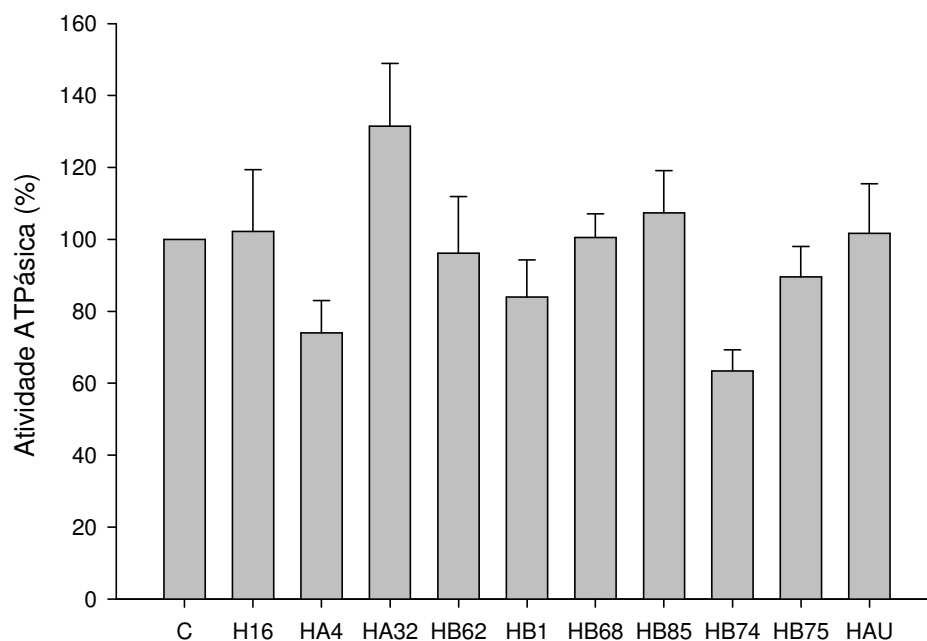


Figura 22. Efeito das chalconas da série H sobre a atividade ATPásica da Pdr5p de *S. Cerevisiae*. A avaliação do efeito desses compostos frente à atividade ATPásica da preparação de membranas foi realizada como descrito anteriormente (ver “Materiais e Métodos”), com uma concentração fixa de 100 μ M ($n = 3 \pm$ S.E.). (C) Controle.

4.8. Efeito dos derivados de ácido gálico sobre o acúmulo de mitoxantrona pela ABCG2 de humanos

Os derivados de ácido gálico utilizados neste trabalho foram testados quanto a sua capacidade de inibir o transporte de mitoxantrona de células HEK-293 transfectadas com o gene *ABCG2*, que leva a uma superexpressão desta proteína, através da técnica de citometria de fluxo. Na Figura 23, podemos verificar que estes compostos não apresentaram qualquer efeito sobre este sistema, exceto o derivado metoxilado do galato de decila, G10M, que apresentou uma porcentagem de 248% em relação às células que superexpressam *ABCG2*, enquanto que o GF120918, nosso controle positivo, produziu um acúmulo de mitoxantrona de 335,11%.

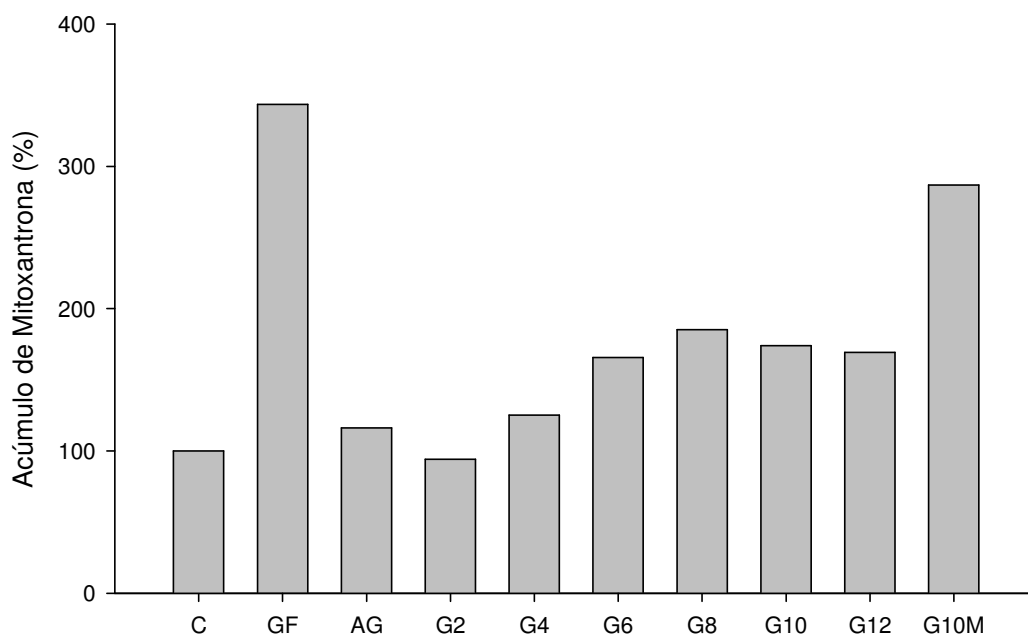


Figura 23. Efeito dos derivados do ácido gálico sobre o acúmulo de mitoxantrona pela células **HEK-293pcDNA3ABCG2**. As células foram incubadas com os compostos a uma concentração final de 10 μM e a mitoxantrona a 5 μM como descrito em “Materiais e Métodos”. Os valores correspondem a um experimento representativo. (C) controle, (GF) GF120918.

4.9. Efeito das diferentes séries de chalconas sobre o transporte pela ABCG2

O primeiro passo na avaliação do efeito dos diferentes grupos de chalconas a serem testados sobre o transportador ABCG2 superexpresso em células HEK-293 foi uma triagem para selecionarmos aqueles com melhor efeito em uma concentração fixa de 10 μM , concentração esta considerada alta quando comparada aos inibidores anteriormente descritos na literatura. Para isso, a metodologia escolhida foi a citometria de fluxo, em que é medido o acúmulo de um determinado composto no interior das células utilizadas. O composto escolhido foi a mitoxantrona, já que a mesma é utilizada na quimioterapia do câncer e, além de ser fluorescente, é um excelente substrato para ABCG2.

O acúmulo de mitoxantrona pelas células que superexpressam o transportador foi considerado como 100%. O inibidor de referência GF120918 a 5 μM produziu um acúmulo de aproximadamente 330 % do valor produzido pelas células controle. Como controle adicional realizamos testes onde os compostos foram incubados somente com as células, na ausência de substrato fluorescente. Nenhuma das drogas testadas apresentou autofluorescência (dados não mostrados).

A Figura 24 mostra os efeitos das chalconas da série L utilizadas neste trabalho, a 10 μM , sobre o acúmulo de mitoxantrona (a 5 μM) sobre as células HEK-293 que superexpressam ABCG2. Podemos observar que alguns compostos foram capazes de produzir um acúmulo de mitoxantrona superior ou igual àquele observado para o inibidor de referência utilizado, o GF120918. Na Figura 25, podemos observar que para a série R, um número maior de compostos foi capaz de produzir uma inibição significativa sobre o

efluxo promovido pela ABCG2. A Figura 26 mostra os efeitos da série H, da qual três chalconas apresentaram um efeito superior ao do GF 120918.

Com os valores para todas as chalconas estudadas a 10 μ M, decidimos selecionar aqueles que produziram um efeito equivalente ao do GF120918 (em torno de 300% de inibição) para dar continuidade a este trabalho. São eles: L11, L14, L23, L28, L29, L38, R5, R12, R15, R21, R25, R27, R29, R44, R45, R46, H16, HA4 e H32.

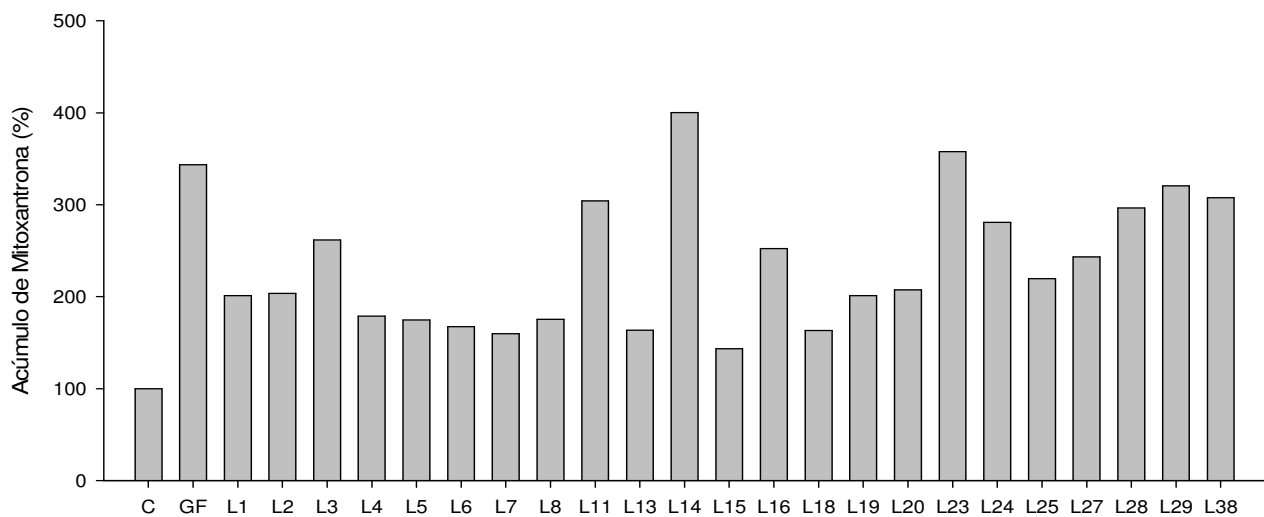


Figura 24. Efeito das chalconas da série L sobre o acúmulo de mitoxantrona pelas células HEK-293pcDNA3ABCG2. As células foram incubadas com os compostos a 10 μM e a mitoxantrona a 5 μM , como descrito em “Materiais e Métodos”. Os valores correspondem a um experimento típico. (C) controle, (GF) GF120918.

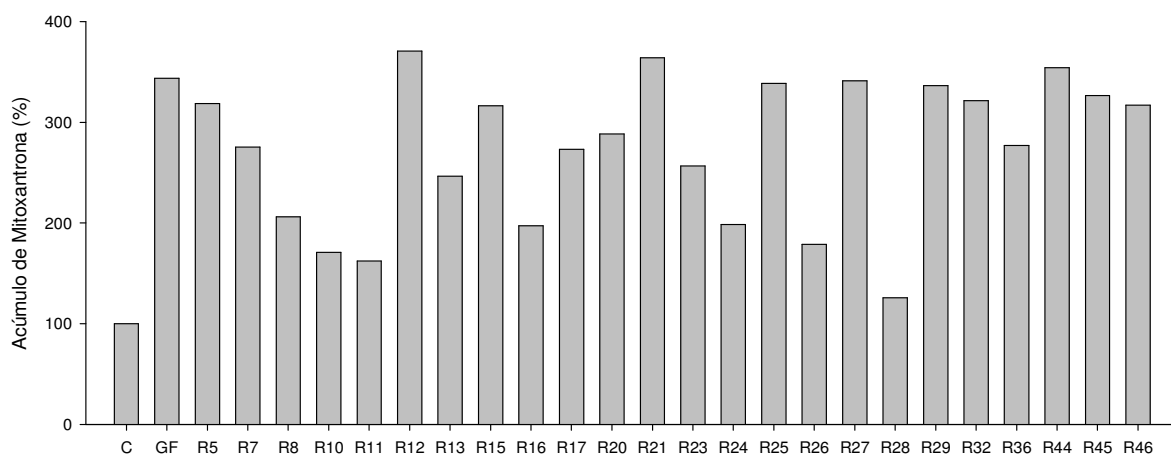


Figura 25. Efeito das chalconas da série R sobre o acúmulo de mitoxantrona pelas células HEK-293pcDNA3ABCG2. As células foram incubadas com os compostos a 10 μM e a mitoxantrona a 5 μM , como descrito em “Materiais e Métodos”. Os valores correspondem a um experimento típico. (C) controle, (GF) GF120918.

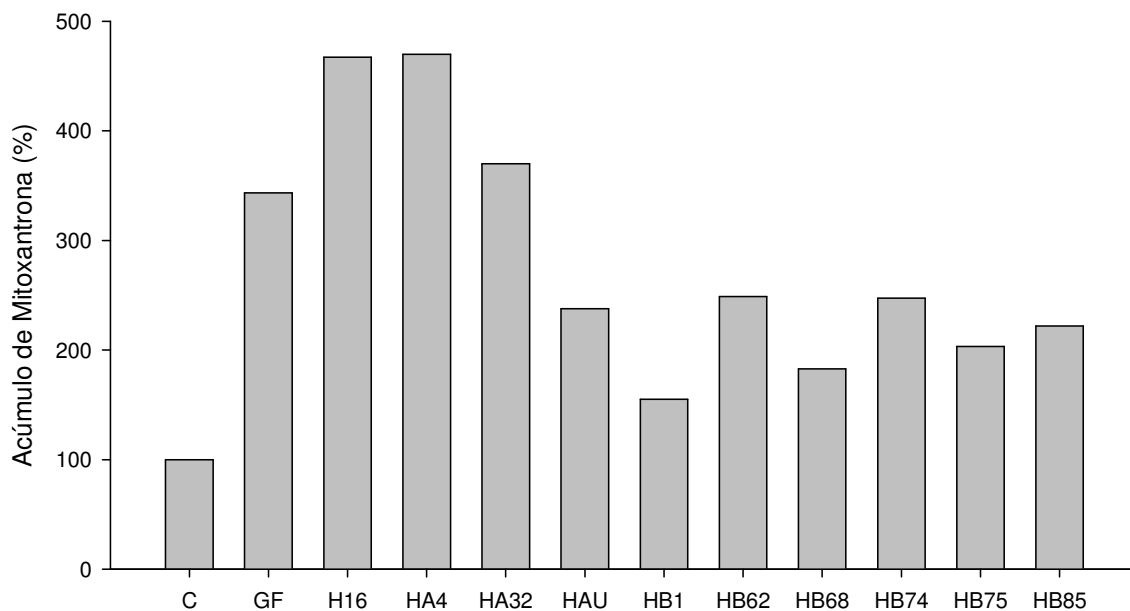


Figura 26. Efeito das chalconas da série H sobre o acúmulo de mitoxantrona pelas células HEK-293pcDNA3ABCG2. As células foram incubadas com os compostos a 10 μM e a mitoxantrona a 5 μM , como descrito em “Materiais e Métodos”. Os valores correspondem a um experimento típico. (C) controle, (GF) GF120918.

4.10. Curvas de dose-resposta com os compostos selecionados das séries L, R e H

Os compostos selecionados na etapa anterior foram utilizados para a obtenção de curvas de dose-resposta para avaliar o acúmulo da mitoxantrona, com concentrações que variaram de 0 a 5 μM . A partir destas curvas, pudemos estimar os valores de IC_{50} para a inibição do transporte promovido por estes compostos, que estão listados na Tabela V. As curvas para os compostos que resultaram nos menores valores de IC_{50} e que produziram uma inibição completa do transporte da proteína são mostradas na Figura 27.

Três desses compostos, um de cada série (L29, R45 e HA32), foram selecionados para continuar nosso estudo, fazendo uso de diversos quesitos, sendo eles: os melhores valores de IC_{50} , a estrutura (para o caso da seleção do composto L29 no lugar do L28, pois a estrutura deste é muito semelhante à do inibidor selecionado da outra série, o R45), a presença de substituintes (para o caso da seleção do R45 no lugar do R29, que não apresenta substituintes) e a inibição próxima à máxima alcançada pelo GF120918 (justificando a escolha de L29 no lugar do L38).

4.11. Modo de inibição das Chalconas estudadas sobre ABCG2

Para estudar o modo de inibição das chalconas utilizadas neste trabalho sobre a ABCG2, optamos por comparar os efeitos das três chalconas selecionadas, uma de cada

grupo, em uma concentração fixa, de 0,5 μM , com concentrações crescentes de mitoxantrona, de 0,5 a 20 μM (Figura 28). Neste experimento, observamos que, em todos os casos, a saturação foi atingida, com K_m semelhante ao da curva controle, sem qualquer inibidor, porém a velocidade máxima não foi alcançada, o que é compatível com o perfil de curva obtido para inibidores não-competitivos. Os valores mostrados no gráfico correspondem ao efluxo de mitoxantrona, calculado a partir da subtração dos valores

Tabela V. Valores de IC₅₀ obtidos a partir do ajuste matemático das curvas de inibição da ABCG2 pelas chalconas das séries L, R e H

Composto	IC₅₀
H16	1,60 ± 0,44 μM
HA4	0,78 ± 0,19 μM
HA32	0,27 ± 0,07 μM
L11	0,99 ± 0,25 μM
L14	0,84 ± 0,31 μM
L23	0,71 ± 0,41 μM
L28	0,22 ± 0,11 μM
L29	0,60 ± 0,11 μM
L38	0,50 ± 0,06 μM
R5	1,10 ± 0,20 μM
R12	1,46 ± 0,49 μM
R15	2,23 ± 1,00 μM
R21	0,91 ± 0,35 μM
R25	2,12 ± 0,68 μM
R27	3,06 ± 0,90 μM
R29	0,13 ± 0,04 μM
R44	0,68 ± 0,13 μM
R45	0,13 ± 0,04 μM
R46	0,16 ± 0,02 μM

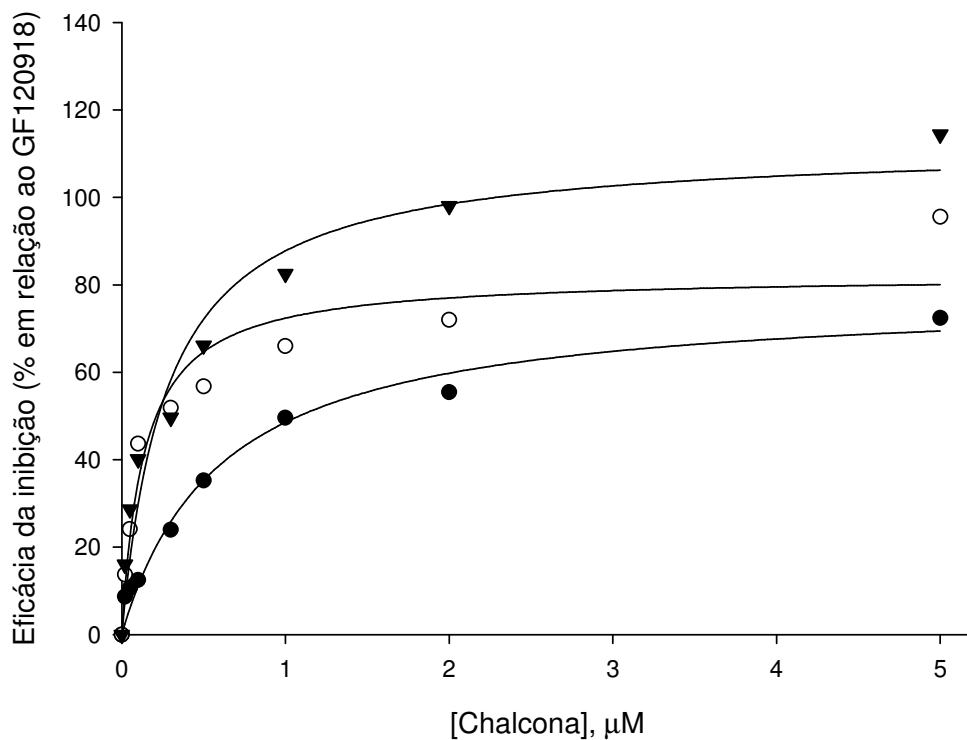


Figura 27. Curvas de inibição do efluxo de mitoxantrona pelas chalconas selecionadas.

As células da linhagem HEK-293*pcDNA3ABCG2* foram incubadas com concentrações de 0,5 a 5 μM dos inibidores e 5 μM de mitoxantrona. (●) L29, (○)R45, (▼) HA32. Os resultados foram calculados utilizando o valor obtido para o GF120918 a 5 μM, considerado como 100 %. Os valores correspondem aos de um experimento típico.

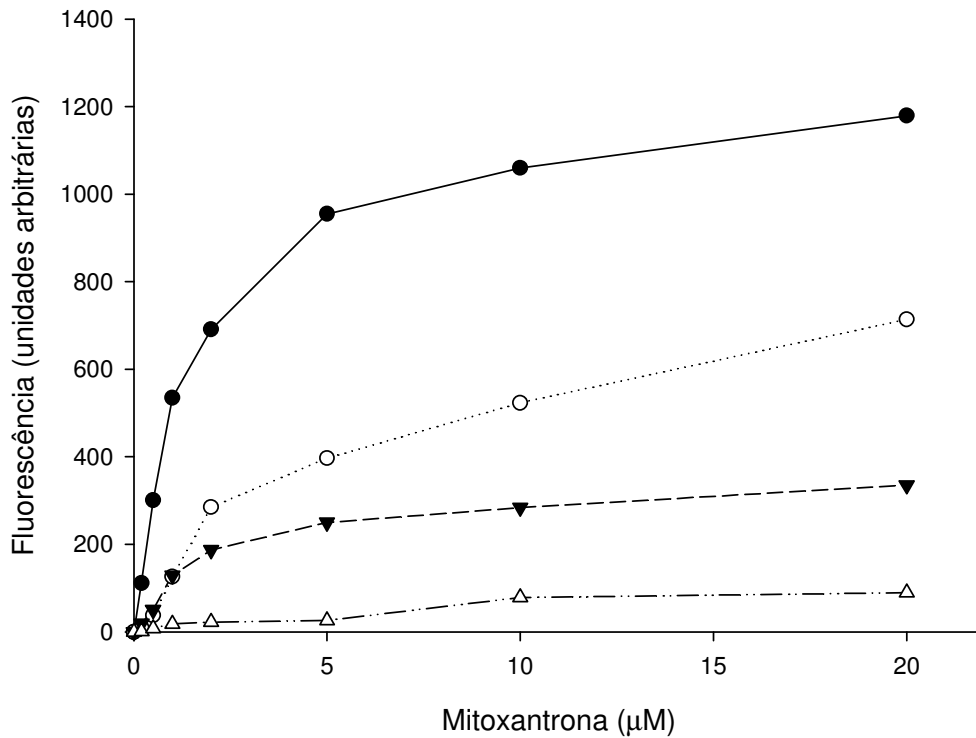


Figura 28. Tipo de inibição do transporte de Mitoxantrona por chalconas das série L, R e H. Curva mostrando acúmulo de mitoxantrona utilizada em concentrações crescentes (0,5 a 20 μM), na ausência (●) ou na presença de 0,5 μM de L29 (○), R45 (▼) e HA32 (△). Os valores obtidos para a linhagem HEK-293pcDNA3ABCG2 foram subtraídos dos valores obtidos para a linhagem HEK-293pcDNA3. Os dados mostrados se referem a um experimento típico.

obtidos com a linhagem HEK-293*pcDNA3ABCG2* pelos valores obtidos com a linhagem HEK-293*pcDNA3*.

4.12. Efeito das diferentes séries de chalconas sobre a Atividade ATPásica da ABCG2

Decidimos comparar as diferenças entre o efeito das três séries de chalconas sobre o transporte de mitoxantrona e a atividade ATPásica da ABCG2. Para isso, testamos o efeito de todas as chalconas utilizadas frente à atividade ATPásica desta proteína na mesma concentração usada na triagem que deu início a este trabalho. Observamos que os efeitos exercidos por estes compostos sobre a atividade ATPásica foram completamente distintos daqueles observados para o transporte de mitoxantrona. Embora a concentração testada nesses estudos seja considerada alta, as inibições ou ativações promovidas por esses compostos foram considerados pequenos. Estes efeitos podem ser observados nas Figuras 29, 30 e 31.

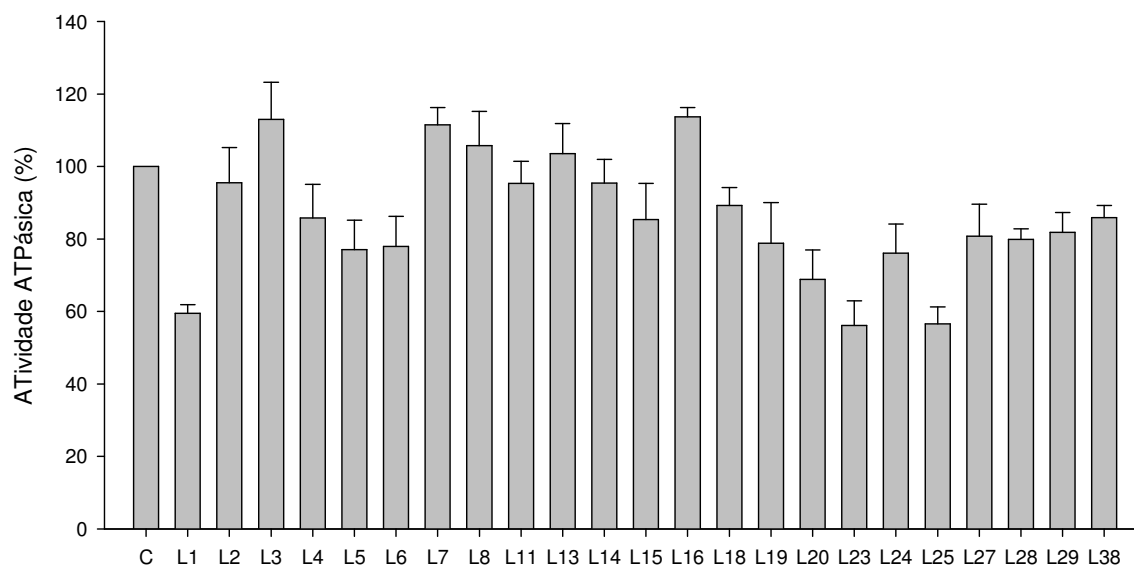


Figura 29. Efeito das chalconas da série L sobre a atividade ATPásica da ABCG2. A atividade ATPásica da ABCG2 foi testada frente às chalconas da série L, na concentração de 10 μ M, em experimento padrão, descrito em “Materiais e Métodos” ($n=3 \pm$ S.E.). (C) controle.

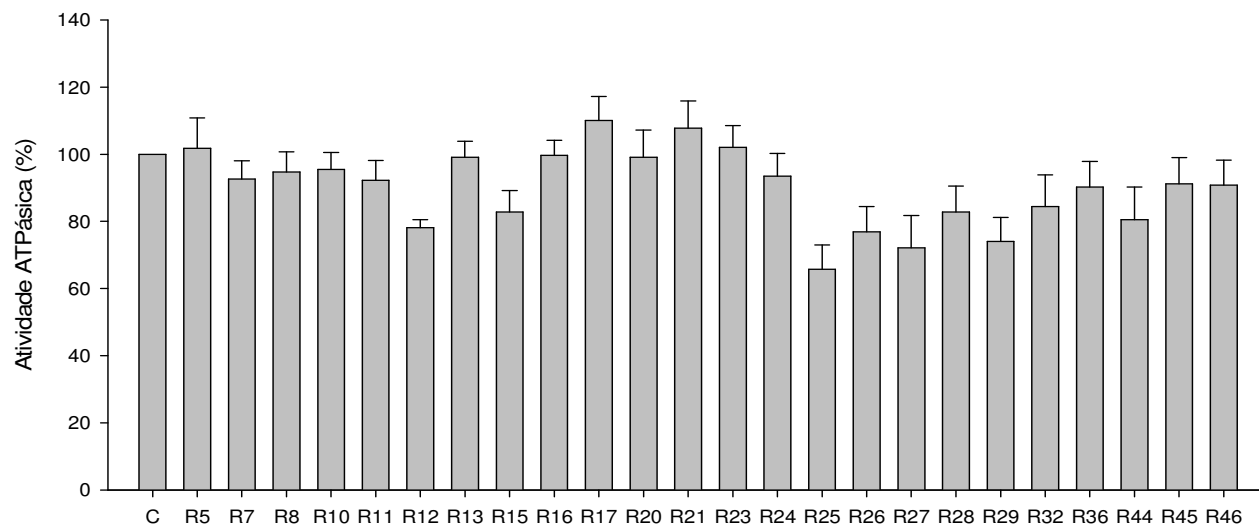


Figura 30. Efeito das chalconas da série R sobre a atividade ATPásica da ABCG2. A atividade ATPásica da ABCG2 foi testada frente às chalconas da série R, na concentração de 10 μ M, em experimento padrão, descrito em “Materiais e Métodos” ($n=3 \pm$ S.E.). (C) controle.

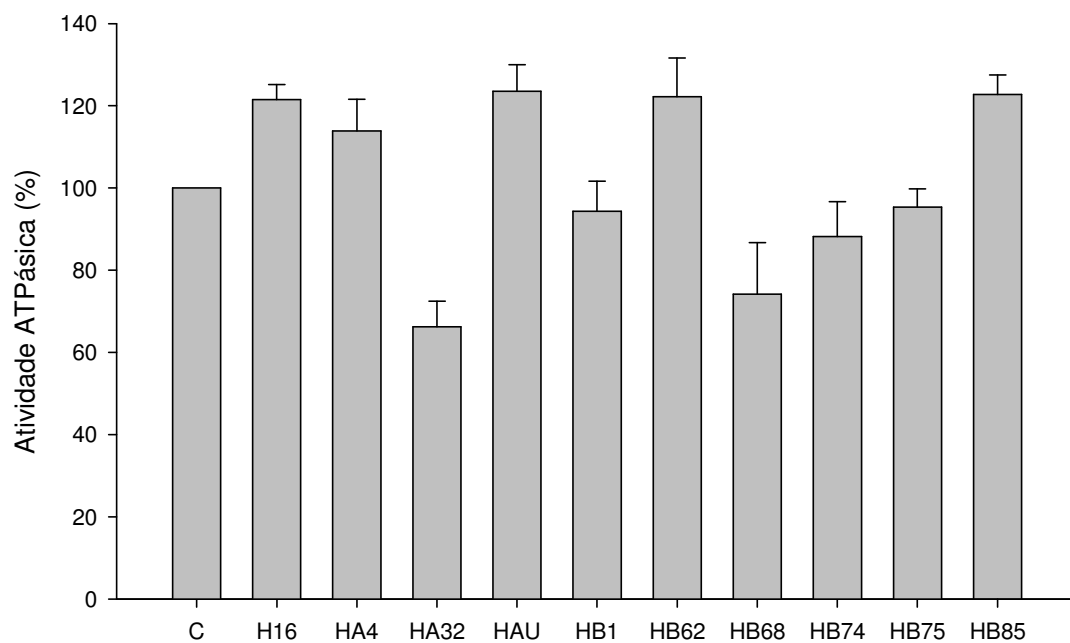


Figura 31. Efeito das chalconas da série H sobre a atividade ATPásica da ABCG2. A atividade ATPásica da ABCG2 foi testada frente às chalconas da série H, na concentração de 10 μ M, em experimento padrão, descrito em “Materiais e Métodos” ($n=3 \pm$ S.E.). (C) controle.

4.13. Citotoxicidade das chalconas selecionadas

Os compostos selecionados nas etapas anteriores deste trabalho tiveram sua citotoxicidade avaliada frente às células utilizadas neste estudo. Neste experimento, utilizamos concentrações crescentes desses compostos, de 1 a 100 μM e os resultados são mostrados na Figura 32. A chalcona L29 mostrou ser a mais citotóxica para as duas linhagens testadas, com IC_{50} para a linhagem HEK-293*pcDNA3ABCG2* de $4,09 \pm 0,59 \mu\text{M}$ e $3,55 \pm 0,74 \mu\text{M}$, para a linhagem HEK-293*pcDNA3*, seguida pela chalcona HA32, com IC_{50} de $14,28 \pm 3,75 \mu\text{M}$ e $6,02 \pm 1,94 \mu\text{M}$ para as linhagens HEK-293*pcDNA3ABCG2* e HEK-293*pcDNA3*, respectivamente. A chalcona R45 mostrou baixa toxicidade para as duas linhagens de células HEK-293 utilizadas neste trabalho.

4.14. Reversão da resistência a mitoxantrona pelas chalconas selecionadas

Os mesmos compostos selecionados foram utilizados na concentração fixa de 1 μM para a observação da reversão da resistência das células que superexpressam ABCG2 à mitoxantrona. Para tal, as células das linhagens HEK-293*pcDNA3ABCG2* e HEK-293*pcDNA3* foram cultivadas por 72 h na presença de concentrações crescentes de mitoxantrona. Em paralelo, as células da linhagem HEK-293*pcDNA3ABCG2* foram cultivadas com as mesmas concentrações de mitoxantrona e as chalconas selecionadas na concentração de 1 μM . Os valores de IC_{50} foram estimados e uma redução neste valor para a linhagem HEK-293*pcDNA3ABCG2* na presença das chalconas indica que ocorreu uma

sensibilização, ou reversão da resistência à mitoxantrona, pelo composto testado. É importante destacar que a concentração selecionada das chalconas para este experimento não era tóxica para nenhuma das duas linhagens utilizadas. Na Figura 33, são mostrados os efeitos das chalconas L29, R45 e HA32. Podemos observar que, para a linhagem que superexpressa ABCG2, na presença das chalconas utilizadas, houve um deslocamento do perfil da curva com a linhagem de células resistentes na direção da linhagem de células

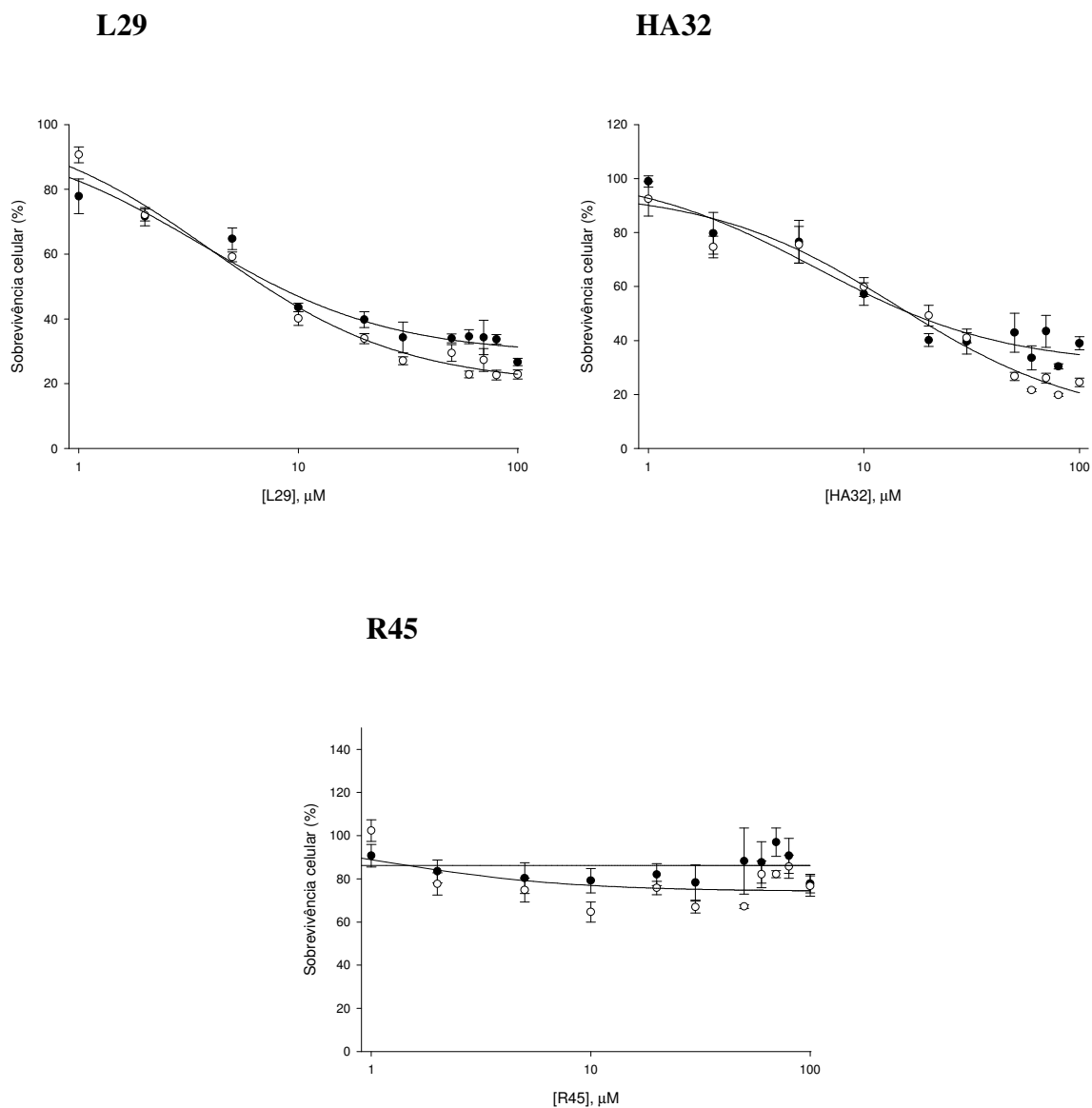


Figura 32. Citotoxicidade das chalconas utilizadas neste trabalho. Os experimentos foram conduzidos como descrito em “Materiais e métodos”. As células HEK-293 *pcDNA3* são representadas por símbolos abertos (○) e as células HEK-293 *pcDNA3-ABCG2* são representadas por símbolos fechados (●) ($n=3 \pm \text{S.E.}$).

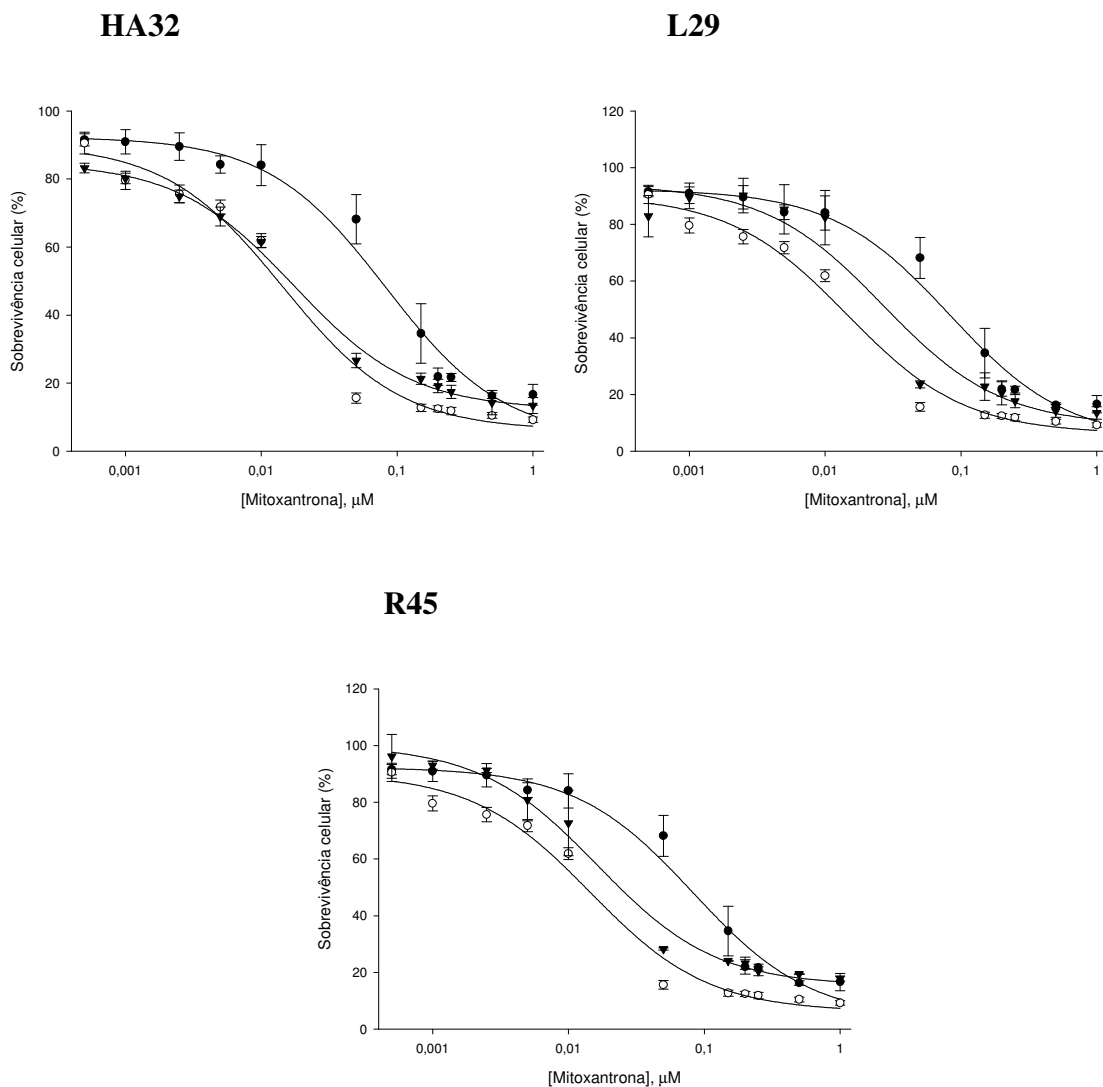


Figura 33. Efeito de sensibilização à mitoxantrona pelas chalconas selecionadas das séries H, L e R. As chalconas foram usadas em uma concentração atóxica para as duas linhagens das células HEK-293 (1 μM) na tentativa de sensibilizar as células resistentes à mitoxantrona. As células HEK-293 *pcDNA3-ABCG2* (●) foram incubadas na presença ou ausência das chalconas e as células HEK-293 *pcDNA3* (○) somente com concentrações crescentes de mitoxantrona. Os valores de IC_{50} para a mitoxantrona nas três situações foram obtidos através do ajuste matemático das curvas, como descrito em “Materiais e Métodos”.

Tabela VI. Valores de IC₅₀ da mitoxantrona para as células HEK-293 *pcDNA3 ABCG2* na presença ou ausência das chalconas (1 μM) e para as células HEK-293 *pcDNA3*.

	HEK-293 <i>pcDNA3 ABCG2</i>	HEK-293 <i>pcDNA3</i>
Controle	0,0828 ± 0,0217 μM	0,0145 ± 0,0036 μM
L29	0,0267 ± 0,0114 μM	-
R45	0,0164 ± 0,0031 μM	-
HA32	0,0175 ± 0,0022 μM	-

sensíveis, o que indica uma redução do IC₅₀ para a mitoxantrona, que foi quase completo para HA32. Na concentração utilizada, para L29 e R45, não foi observado um efeito completo, porém, observamos uma diminuição significativa no IC₅₀ da mitoxantrona. Os valores de IC₅₀ da mitoxantrona para as células HEK-293 *pcDNA3ABCG2* na presença ou ausência das chalconas utilizadas são mostrados na Tabela VI.

4.15. Efeito das diferentes séries de chalconas sobre o transporte pela glicoproteína-P

Após definir que as chalconas são bons inibidores para ABCG2 e selecionar os melhores compostos de cada série, decidimos verificar a especificidade desses inibidores para esta proteína, testando se estes compostos seriam também inibidores de outros transportadores normalmente expressos em células cancerosas. Para isso, escolhemos testá-los frente à glicoproteína-P (P-gp, ou ABCB1), na mesma concentração utilizada inicialmente para ABCG2, que foi de 10 µM. Nas Figuras 34, 35 e 36, podemos ver que todas as três séries de chalconas foram incapazes de promover um efeito inibitório sobre a P-gp, levando, inclusive, a um acúmulo de mitoxantrona menor do que o observado para o controle com as células HEK-293 *pcDNA3ABCB1* sem a adição de qualquer inibidor. O inibidor GF120918 a 5 µM também foi utilizado como referência neste experimento.

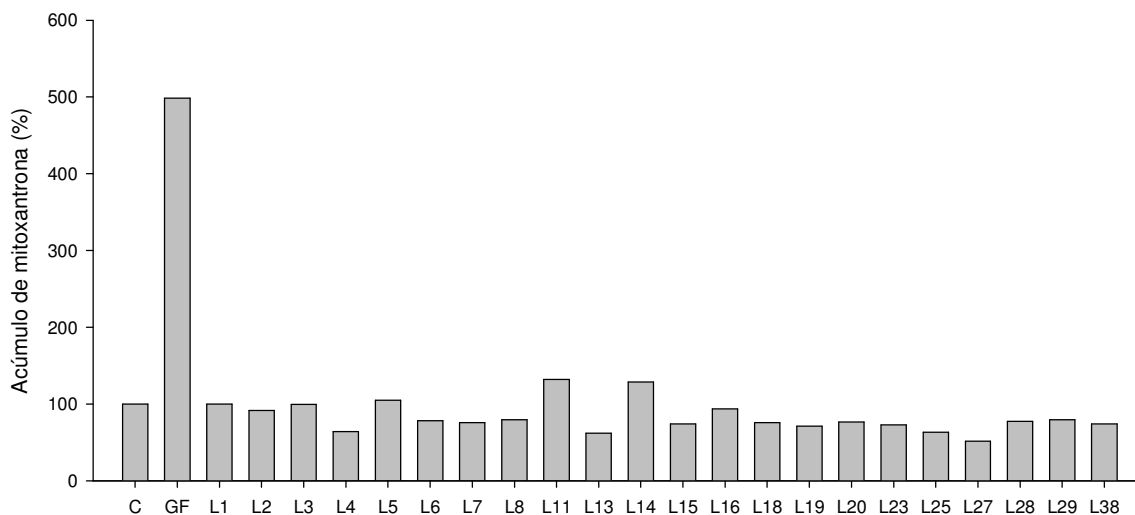


Figura 34. Efeito das chalconas da série L sobre o acúmulo de mitoxantrona promovido pela Glicoproteína-P. As chalconas utilizadas neste trabalho foram testadas a 10 μM sobre células da linhagem HEK-293 *pcDNA3ABCBI*, como descrito em “Materiais e Métodos”, com o inibidor GF120918 a 5 μM como controle positivo. Os dados correspondem a um experimento padrão. (C) controle, (GF) GF120918.

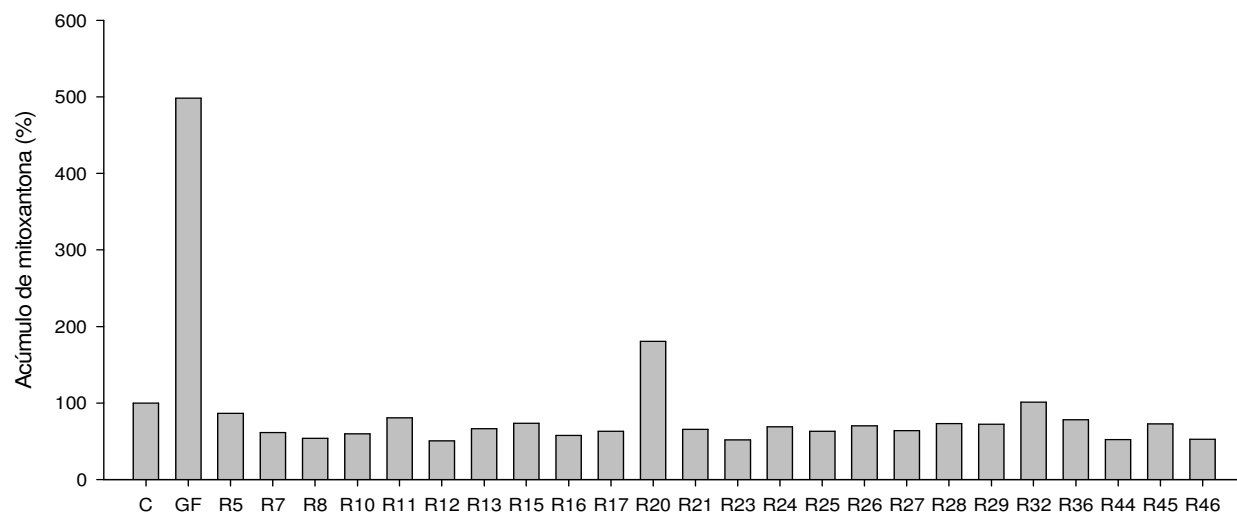


Figura 35. Efeito das chalconas da série R sobre o acúmulo de mitoxantrona promovido pela Glicoproteína-P. As chalconas utilizadas neste trabalho foram testadas a 10 μ M sobre células da linhagem HEK-293 *pcDNA3ABCBI*, como descrito em “Materiais e Métodos”, com o inibidor GF120918 a 5 μ M como controle positivo. Os dados correspondem a um experimento padrão. (C) controle, (GF) GF120918.

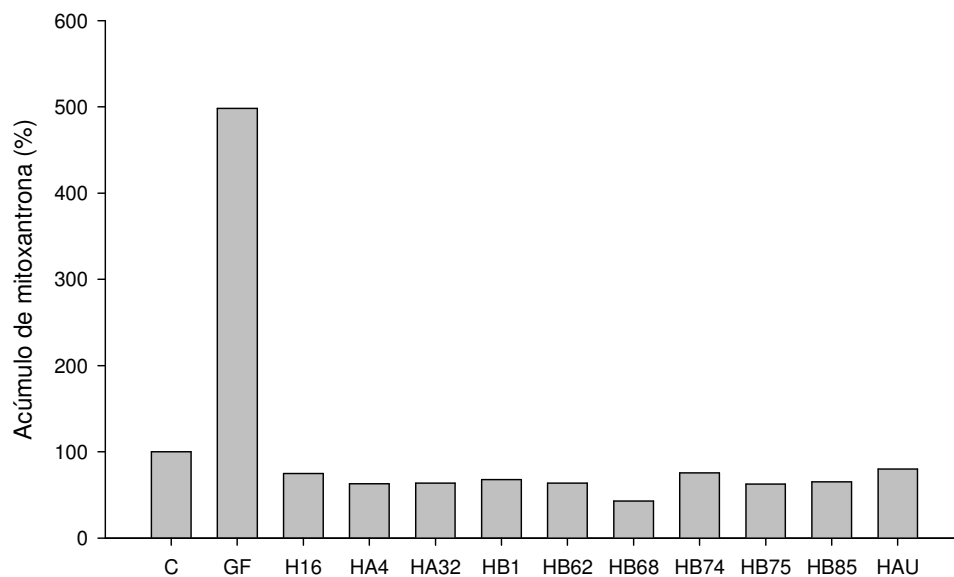


Figura 36. Efeito das chalconas da série H sobre o acúmulo de mitoxantrona promovido pela Glicoproteína-P. As chalconas utilizadas neste trabalho foram testadas a 10 μ M sobre células da linhagem HEK-293 *pcDNA3ABCBI*, como descrito em “Materiais e Métodos”, com o inibidor GF120918 a 5 μ M como controle positivo. Os dados correspondem a um experimento padrão. (C) controle, (GF) GF120918.

4.16. Efeito das diferentes séries de chalconas sobre o transporte pela MRP1

Dando continuidade à avaliação da especificidade desses inibidores frente a ABCG2, testamos também esses compostos sobre o transporte de outro transportador ABC superexpresso em células cancerosas, MRP1 (ou ABCC1). O experimento para medida do transporte pela proteína foi feito com um substrato fluorescente diferente, pois, apesar de ser caracterizada na literatura como um transportador que tem a mitoxantrona como substrato, a proteína MRP1 transporta este quimioterápico apenas fracamente, o que dificultaria a avaliação do resultado. Sendo assim, foi utilizada a calceína como substrato fluorescente. Observamos que, para este transportador (Figuras 37, 38 e 39), as três séries de chalconas produziram efeitos mínimos sobre o transporte de calceína. O inibidor de referência utilizado neste caso foi o MK571 a 30 μ M.

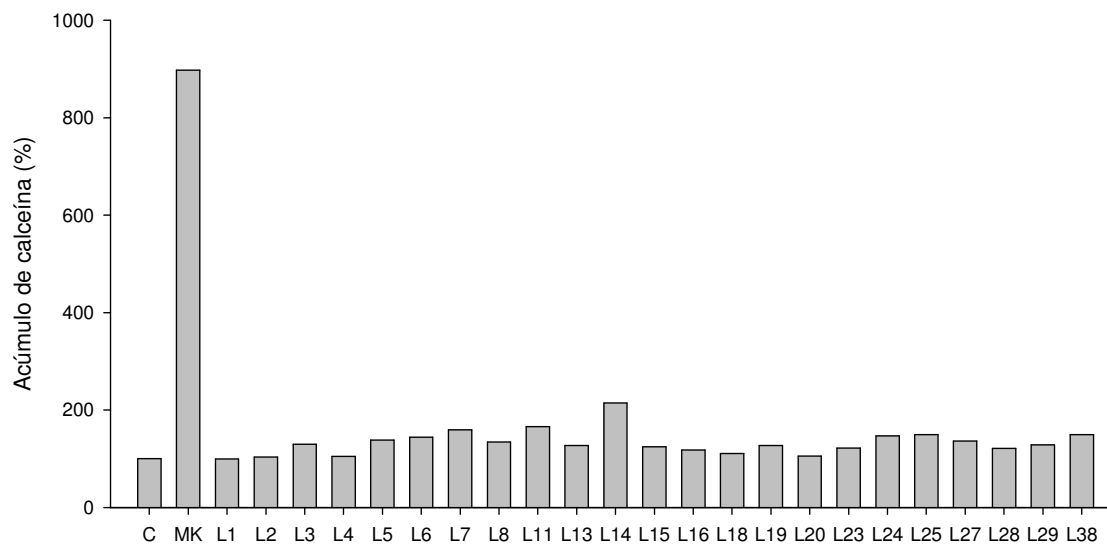


Figura 37. Efeito das chalconas da série L a 10 μ M sobre o transporte de calceína pela linhagem de células HEK-293 que superexpressa MRP1. As chalconas utilizadas neste trabalho foram testadas a 10 μ M sobre células da linhagem HEK-293*pcDNA3ABCC1*, com o inibidor de referência MK571 a 30 μ M como controle positivo. O experimento foi realizado como descrito em “Materiais e Métodos”. (C) controle, (MK) MK571.

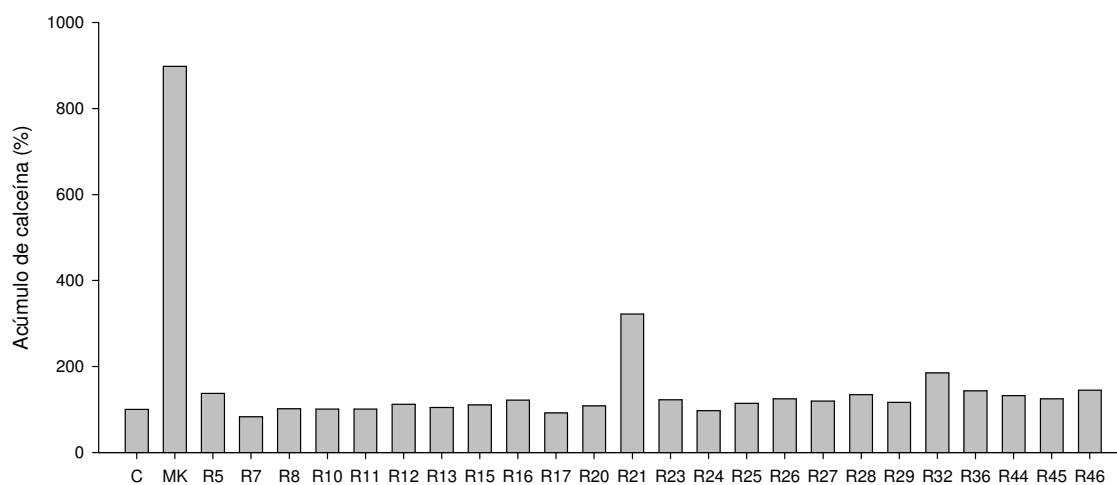


Figura 38. Efeito das chalconas da série R a 10 μ M sobre o transporte de calceína pela linhagem de células HEK-293 que superexpressa MRP1. As chalconas utilizadas neste trabalho foram testadas a 10 μ M sobre células da linhagem HEK-293*pcDNA3ABCC1*, com o inibidor de referência MK571 a 30 μ M como controle positivo. O experimento foi realizado como descrito em “Materiais e Métodos”. (C) controle, (MK) MK571.

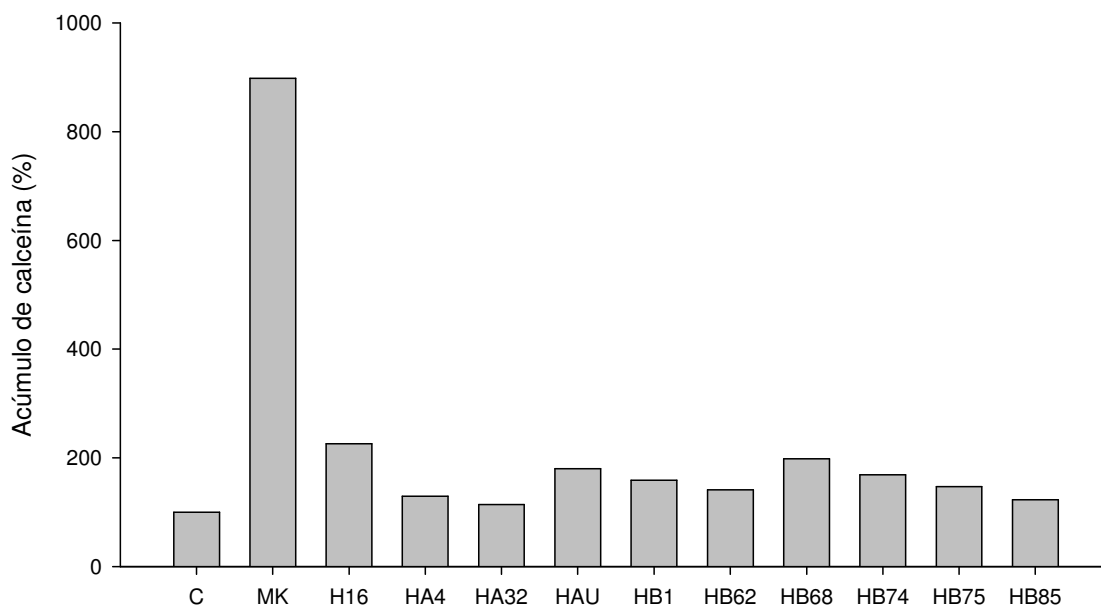


Figura 39. Efeito das chalconas da série H a 10 μ M sobre o transporte de calceína pela linhagem de células HEK-293 que superexpressa MRP1. As chalconas utilizadas neste trabalho foram testadas a 10 μ M sobre células da linhagem HEK-293*pcDNA3ABCC1*, com o inibidor de referência MK571 a 30 μ M como controle positivo. O experimento foi realizado como descrito em “Materiais e Métodos”. (C) controle, (MK) MK571.

5. DISCUSSÃO

A resistência a múltiplas drogas é um fenômeno que emergiu após, e por causa, da descoberta da quimioterapia. Apesar de os transportadores ABC possuírem uma origem evolucionária antiga, uma vez que podem ser encontrados nos mais diversos seres vivos, eles só tiveram destaque, chamando a atenção dos pesquisadores, depois que a resistência a drogas começou a causar problemas para a medicina (LAGE, 2008). O funcionamento desses transportadores está envolvido na manutenção de diversos processos fisiológicos dos organismos que os expressam, participando de funções como a captação de nutrientes, manutenção do equilíbrio de íons, defesa da célula de produtos de seu catabolismo ou mesmo a proteção de todo o organismo de certas substâncias através de sua expressão em tecidos como a barreira hematoencefálica, intestino ou placenta (Ayrton & Morgan, 2001), o que leva a um papel fisiológico importante na proteção e na manutenção de seu bom funcionamento. Entretanto, em processos descontrolados, como é o caso de tumores, a presença desses transportadores passa de benigna a extremamente danosa, impedindo o sucesso da quimioterapia anticâncer e levando à necessidade de combate ao seu funcionamento. Na quimioterapia antimicrobiana, o problema também é encontrado, uma vez que esses transportadores estão presentes em cepas resistentes e precisam ser combatidos para que as drogas já existentes possam voltar a ter sucesso (NIIMI *et al.*, 2004). São essas as razões que fazem da busca por inibidores para esses transportadores de enorme importância. No entanto, esse trabalho envolve processos extremamente delicados, que demandam muitos esforços e a criação de estratégias diferentes para cada caso.

Neste trabalho, procuramos contribuir para a evolução do conhecimento nesta área de estudo através do aprofundamento das informações sobre duas classes de inibidores ainda pouco exploradas. Procuramos avaliar os efeitos produzidos sobre dois transportadores, que, apesar de serem expressos em sistemas bastante distantes, pertencem a um mesmo grupo, devido a semelhanças estruturais (LAGE, 2003). As proteínas Pdr5p e a ABCG2 são classificadas como transportadores invertidos, apresentado na sua porção N-terminal um sítio de ligação a nucleotídeos (Figura 3).

Buscamos também, através de uma ampla triagem de compostos, iniciar estudos de relação estrutura-atividade, de modo a encontrar melhores inibidores para esses transportadores, o que poderia proporcionar uma nova alternativa à quimioterapia existente. Além disso, pretendemos contribuir para um melhor entendimento do processo de inibição e funcionamento dessas proteínas.

Os ésteres derivados do ácido gálico nunca tiveram seu efeito avaliado sobre transportadores MDR de fungos, como a Pdr5p. Por essa razão, achamos interessante descrever uma nova função para essa classe de compostos, que são normalmente utilizados como aditivos em alimentos devido a sua atividade antioxidante (KUBO *et al.*, 2002; MASAKI *et al.*, 1997). Estes poderiam ser adaptados à quimioterapia como um adjuvante para os antifúngicos já disponíveis, que são frequentemente transportados por bombas de efluxo em cepas resistentes a drogas.

Para os derivados de ácido gálico utilizados neste trabalho, começamos a triagem através da observação de seus efeitos sobre a atividade ATPásica da Pdr5p e sobre o transporte de rodamina 6G. Observamos que a inibição promovida por esses compostos ocorre de forma bastante semelhante para as duas funções. Esta inibição demonstrou-se dependente do tamanho da cadeia lateral desses compostos, já que os melhores efeitos

foram observados quando esta variava de 8 a 16 carbonos, sendo que os galatos de decila e dodecila foram os que demonstraram um efeito inibitório mais pronunciado. As atividades ATPásica e UTPásica da Pdr5p foram inibidas de maneira dose-dependente, enquanto que a atividade ATPásica foi inibida em grau muito menor pelo ácido gálico e o 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila. Por esta razão, nós decidimos verificar o mecanismo de inibição desses compostos sobre a Pdr5p, primeiramente investigando o tipo de inibição realizada sobre a atividade ATPásica. Demonstramos então que o galato de decila e o galato de dodecila são capazes de promover uma inibição do tipo competitiva sobre a atividade ATPásica da Pdr5p, com valores de K_i real de $21,3 \pm 3,28 \mu\text{M}$ para o galato de decila e de $15,7 \pm 1,45 \mu\text{M}$ para o galato de dodecila, calculados a partir dos valores obtidos nos gráficos de duplo-recíproco, que estão na mesma ordem de grandeza daqueles encontrados nos gráficos de dose-resposta, que correspondem ao K_i aparente para esses inibidores.

Os compostos galato de octila e galato de decila já tiveram seus efeitos descritos sobre a P-gp de humanos (KITAGAWA *et al.*, 2005). Os autores desse trabalho sugerem que tanto o grupamento galoila como o grupamento alquila são importantes para a capacidade inibitória desses compostos, apesar de que uma cadeia lateral muito volumosa promoveria um efeito de impedimento estérico e impediria a ligação, ou interação, adequada, entre o inibidor e a proteína. Além disso, BOIS e colaboradores (1999) mostraram que o aumento da cadeia alquila lateral na posição 4 de chalconas era capaz de melhorar a interação entre o NBD2 da P-gp de camundongos e esses inibidores, com um efeito ótimo alcançado com um substituinte de 8 carbonos (O-*n*-octila), mas com efeitos similares e próximos para a O-*n*-decila. Esses dados são interessantes, já que a Pdr5p e a P-gp são ambos transportadores ABC e demonstram uma certa homologia e uma estrutura tridimensional relativamente

semelhante. Entretanto, neste trabalho, nós mostramos que existe um ponto de corte para a inibição da Pdr5p pelos galatos de alquila, que é um pouco diferente daquele mostrado para a inibição da P-gp e para outras atividades biológicas desses derivados de ácido gálico, assim como para sua atividade antifúngica (KUBO, XIAO & FUJITA, 2001; LEAL *et al.*, 2009).

FUJITA & KUBO (2002) mostraram que o galato de nonila possui a melhor atividade antifúngica entre uma série de galatos de alquila testada, que estaria relacionada com a sua capacidade de romper membranas celulares, agindo como um surfactante. O galato de octila também demonstrou ter atividade antifúngica, apesar de os autores descreverem que o comprimento da cadeia lateral não seria o contribuinte majoritário, mas teria um papel importante na atividade do composto. Os autores reportam que o oxigênio presente no grupamento galoila seria capaz de desfazer as pontes de hidrogênio, que são responsáveis pela estrutura das proteínas, levando a sua inativação. A ação mais importante desses derivados seria, então, de inativar a proteína mais abundante da membrana plasmática de fungos, a Pma1p (H⁺-ATPase), o que induziria a morte celular. Esses trabalhos também mostram que este efeito não é realizado pelo galato de decila, um bom inibidor no nosso sistema, devido a seu grande comprimento de cadeia lateral. Sendo assim, para a inibição da P-gp, bem como para a atividade antifúngica, o ponto de corte estaria entre 9 ou 10 carbonos na cadeia lateral, enquanto que para a Pdr5p, o efeito seria percebido até o composto os 16 carbonos, mesmo que atenuado. É importante mencionar também que, nesses trabalhos, as concentrações usadas para a atividade antifúngica (MIC, 12,5 µg/ml ou 40,32 µM, e MFC, 25µg/ml ou 80,64 µM) e para produção de danos à membrana plasmática dos fungos foram superiores às aquelas usadas no nosso estudo, o que indica que nossos compostos teriam sido utilizados em concentrações subletais se tivessem os efeitos

descritos para os galatos de octila e nonila. Além disso, nós avaliamos a viabilidade celular dessas cepas após 2 h de incubação com galatos de decila e dodecila para as microscopias de fluorescência (dados não mostrados) e a concentração utilizada nesse teste, de 25 μ M, não alterou o crescimento da cepa AD124567, quando comparada ao controle, levando a crer que os mesmos não causariam nenhum dano celular neste tempo de incubação e, por isso, os efeitos promovidos por estes compostos teriam ocorrido exclusivamente sobre a enzima responsável pelo transporte de rodamina 6G, a Pdr5p.

Os resultados obtidos para os galatos neste trabalho também podem ser explicados pelo balanço entre a lipofilicidade e a hidrofiliabilidade dos compostos testados. A lipofilicidade dos galatos, que aumenta com o aumento da cadeia lateral (ROSSO *et al.*, 2006), é um fator a ser considerado, já que leva a uma maior afinidade a ambientes lipofílicos (por exemplo, membranas). Já foi demonstrado que a hidrofobicidade de uma molécula é um dos fatores que participam da interação da mesma com a Pdr5p (GOLIN *et al.*, 2007a). Diversos estudos já demonstraram também que a lipofilicidade é importante para a atividade dos galatos como antioxidantes e inibidores de enzimas (MASAKI *et al.*, 1997; ROSSO *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2006) e para a sua citotoxicidade em linhagens celulares (DI PIETRO *et al.*, 2002; FIUZA *et al.*, 2004).

Além da cadeia lateral, a presença de hidroxilas no anel benzênico também é importante para a atividade dos galatos. Nossos resultados mostraram que a substituição das hidroxilas do galato de decila no anel fenólico, que deu origem ao composto 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila leva à falta de atividade inibitória do mesmo. Assim, para os galatos de alquila, as cadeias laterais moderadamente longas e três grupos hidroxila no anel catecólico parecem ser quesitos importantes para a inibição da Pdr5p. As hidroxilas e as características hidrofóbicas nos grupamentos do ácido gálico podem ser importantes para as

interações polares citoplasmáticas e para a interação com o sítio de ligação a drogas presentes nos domínios transmembranares, respectivamente, o que poderia indicar uma interação bifuncional, como descrita anteriormente para os flavonóides sobre a P-gp (CONSEIL *et al.* 1998).

Em estudos utilizando flavonóides sobre a Pdr5p (CONSEIL *et al.*, 2000), observou-se uma inibição do tipo não-competitiva pelo sítio de ligação de ATP, com os inibidores agindo na faixa de 2,5 a 50 μ M. Entretanto, DI PIETRO e colaboradores (2002) relataram um efeito inibitório de diversos flavonóis, uma classe de flavonóides, sobre a P-gp de mamíferos, com ação sobre o sítio de ligação a nucleotídeos. A molécula seria capaz de sobrepor tanto o NBD, quanto uma região mais hidrofóbica, em que se acredita que se liguem esteróides, presente também no domínio citoplasmático da proteína. Neste caso, os flavonóis, que são compostos de três anéis planares conjugados, apresentando hidroxilas nas posições 5 e 7 do anel A, se ligariam ao NBD, produzindo o efeito inibitório por apresentar uma estrutura similar à da adenina, que compõe a molécula de ATP (Figura 40). Outros flavonóides, com cadeias laterais hidrofóbicas, como radicais prenila, seriam capazes de se ligar apenas ao sítio vizinho onde ocorre a ligação de esteróides, aumentando a interação com o TMD pela hidrofobicidade da cadeia lateral (Figura 41) (DI PIETRO *et al.*, 2002).

A partir dos resultados encontrados na literatura, a nossa proposta é que a interação do ácido gálico com o sítio de ligação de ATP se daria de forma semelhante àquela mostrada para os flavonóis, ou seja, por uma semelhança estrutural com a adenina do ATP. O fato de este inibidor competitivo apresentar para seu radical galoila um tamanho bastante inferior ao da molécula de ATP poderia levar a uma ocupação do NBD apenas de forma

parcial, o que geraria uma flexibilidade para a interação da cadeia lateral, que é apolar, com uma região hidrofóbica próxima da proteína que seria provavelmente pertencente ao domínio transmembranar da mesma. Este efeito seria justificado pelos valores próximos de IC_{50} para a atividade ATPásica e para o transporte de rodamina 6G, que é feito através da ligação ao TMD (ERNST *et al.*, 2008).

Não existem relatos na literatura que descrevam um sítio específico de ligação de esteróides à Pdr5p, como descrito para a P-gp, porém sabe-se que estes se ligam aos domínios transmembranares e que são transportados pela proteína (KOLACZKOWSKI *et al.*, 1996; KOLACZKOWSKI *et al.*, 1998; MAHÉ *et al.*, 1996), enquanto que derivados de esteróides (mais lipofílicos), como RU49953 (CONSEIL *et al.*, 2003), ligam-se a este sítio mas não são transportados, agindo como inibidores da proteína em questão. A interação de prenil-flavonóides com a Pdr5p se dá através da ligação a um dos TMDs (CONSEIL *et al.*, 2000), como ocorre com os esteróides, sem que ocorra o transporte de alguns, o que caracteriza os que não são transportados como inibidores. Entretanto, para os derivados do ácido gálico, a interação poderia acontecer de outra forma, com estes compostos se ligando ao NBD e produzindo uma inibição da hidrólise de nucleotídeos, por impedir que estes se liguem adequadamente ao seu sítio.

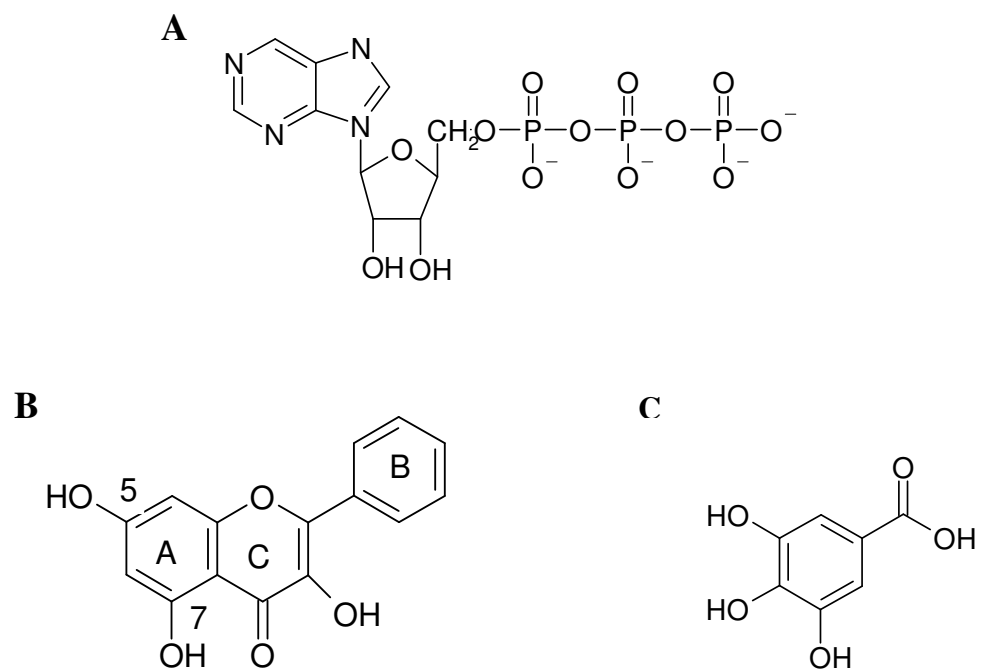


Figura 40. Estruturas de espécies químicas – Figura esquemática das estruturas dos compostos químicos capazes de interagir com o sítio de ligação a nucleotídeos da glicoproteína-P de mamíferos: **(A)** ATP e **(B)** flavonóis hidroxilados nas posições 5 e 7 do anel A. **(C)** Estrutura do ácido gálico.

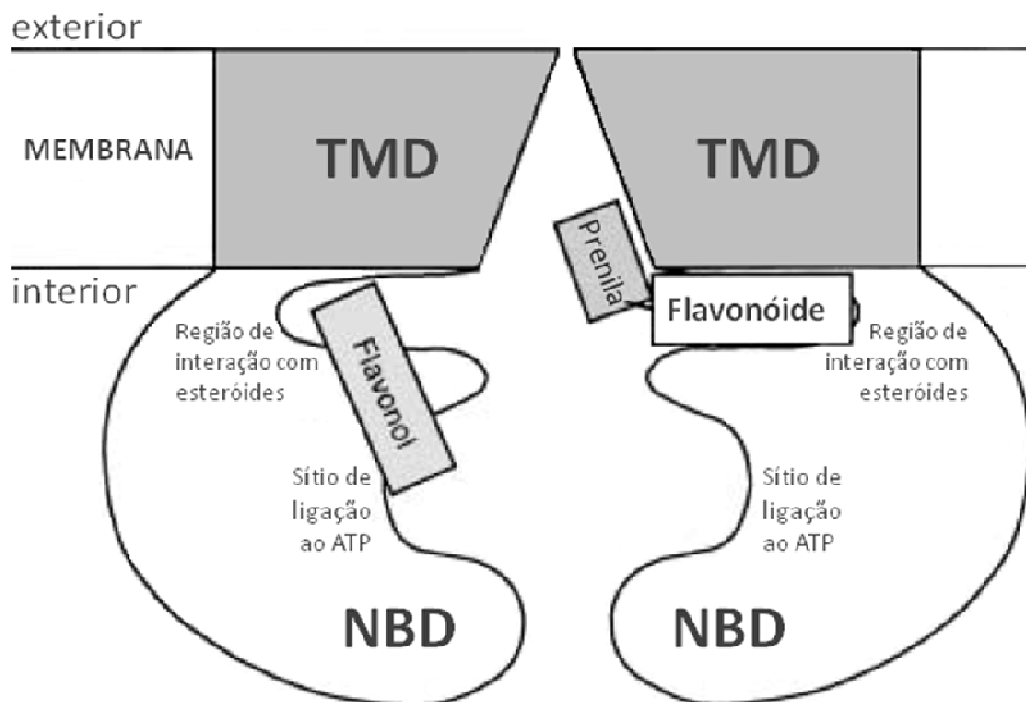


Figura 41. Esquema para a interação de flavonóis e prenil-flavonóides com a glicoproteína-P de mamíferos e transportadores de múltiplas drogas relacionados. Os flavonóis, como kaempferide, galangina ou dehidrosilibina, realizariam interações bifuncionais com os domínios citoplasmáticos da proteína, ligando-se tanto aos NBDs, quanto a uma região vizinha, capaz de interagir com esteróides e derivados, tais como RU486. A prenilação favoreceria grandemente a interação com a região de ligação a esteróides e com o domínio transmembranar, o que impediria a sobreposição ao sítio de ligação de nucleotídeos (extraído de DI PIETRO *et al.*, 2002).

Apesar da homologia entre a Pdr5p e a P-gp de mamíferos, existem diferenças estruturais e estas incluem a disposição dos sítios de ligação a nucleotídeos, que na P-gp estão invertidos, ou seja, voltados para lados opostos, enquanto que na Pdr5p, eles se dispõem de forma especular (Figura 42). É possível que a disposição dos NBDs na Pdr5p impeça que os flavonóis tenham a mesma ação observada na P-gp, por uma questão espacial de acesso ao NBD. Neste caso, o radical galóila, por ser menor, poderia ter condições de interagir com o NBD e promover a inibição da ligação dos nucleotídeos trifosfatados. Adicionalmente, o grupamento alquila, mais apolar, interagiria também com uma região mais hidrofóbica, o que potencializaria sua inibição com relação ao ácido gálico, que tem IC_{50} de 1,09 mM (dados não mostrados) e poderia estar se ligando apenas ao NBD. Esta hipótese também seria justificada pelo valor de IC_{50} obtido para o efluxo de rodamia 6G por esses compostos, que é uma ordem de grandeza menor que aquele observado para a inibição da atividade ATPásica, o que comprovaria a interação desses compostos com o TMD, além da interação com o NBD.

FERREIRA-PEREIRA e colaboradores (2003) demonstraram uma estrutura dimérica da Pdr5p, através da reconstrução tridimensional da proteína, com os sítios de ligação a nucleotídeos de cada monômero orientados perpendicularmente, sugerindo movimentos de rotação durante seu ciclo catalítico. Por esta razão, poderíamos propor também que a rotação destes NBDs durante o ciclo catalítico exponha mais a região de ligação do nucleotídeo e facilite a entrada do ácido gálico e de seus derivados. Sendo assim, este poderia se ligar em um determinado momento do ciclo, passando a promover a inibição da ligação de novas moléculas de nucleotídeo trifosfatado.

O efeito desses derivados do ácido gálico sobre a Pdr5p não se repetiu para ABCG2. Numa triagem inicial, testamos esses compostos a 10 μ M e o efeito observado foi um

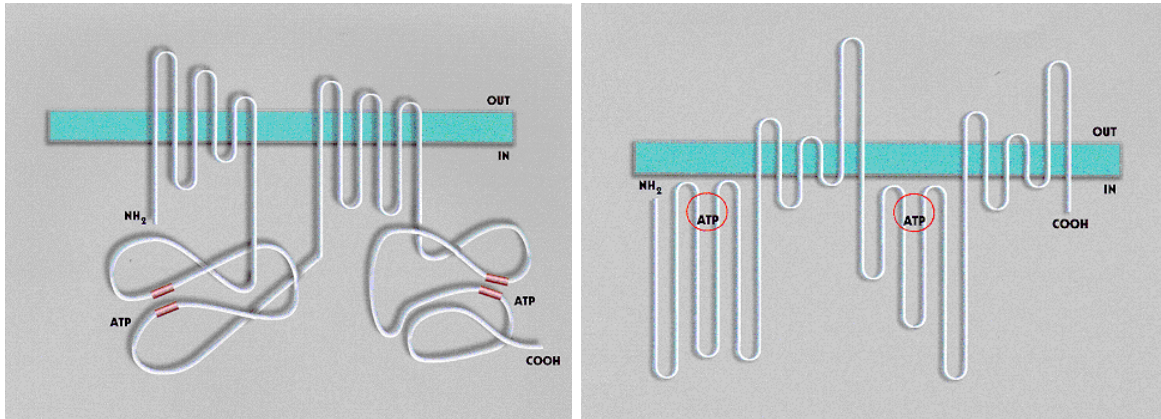


Figura 42. Modelos estruturais propostos para dois transportadores ABC. À esquerda, representação esquemática da Glicoproteína-P de mamíferos. Modelo extraído e modificado de ENDICOTT & LING (1989). À direita, representação esquemática da Pdr5p de leveduras. Modelo extraído e modificado de BALZI e colaboradores (1994).

acúmulo de mitoxantrona inferior àquele observado para as células HEK-293 que superexpressam o transportador, exceto para o 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila, que induziu um acúmulo de mitoxantrona próximo a 70% do efeito do inibidor de referência, o GF120918. Quando testamos esses compostos em uma concentração mais alta, o efeito continuou sendo fraco (dados não mostrados), o que nos levou a crer que os galatos não são capazes de se ligar à ABCG2 como a P-gp e Pdr5p. O 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila também foi testado em uma concentração inferior, de 2 μM (dados não mostrados), mas não apresentou a mesma capacidade de inibição na concentração mais baixa, quando comparado ao GF120918 também a 2 μM . Isso nos leva a crer que ele teria uma maior capacidade de se ligar a ABCG2 devido às metoxilas presentes em sua estrutura, mas com a ligação ocorrendo com baixa afinidade. Por esta razão, não continuamos o estudo com este composto.

As chalconas das três séries utilizadas neste trabalho foram inicialmente testadas sobre o efluxo de rodamina 6G da Pdr5p a 10 μM . Entretanto, nesta concentração, nenhuma foi capaz de produzir qualquer efeito inibitório significativo sobre a Pdr5p (dados não mostrados). Sendo assim, decidimos utilizar uma concentração mais alta, para selecionarmos alguns compostos e, a partir deles, produzir uma nova geração de compostos que poderiam se mostrar mais eficientes na inibição dessa enzima. A concentração escolhida foi de 100 μM e, com esta, pudemos observar o efeito de alguns desses compostos sobre o transporte de rodamina 6G promovido pela Pdr5p. Avaliamos também o efeito dos mesmos sobre a atividade ATPásica da Pdr5p, e pudemos observar que a inibição do efluxo de rodamina 6G não estava relacionada à inibição da atividade catalítica da enzima, ou seja, os compostos que produziram um efeito inibitório sobre o transporte de rodamina 6G não foram capazes de promover uma inibição da atividade ATPásica da

proteína, na mesma concentração. O único composto capaz de produzir um efeito significativo sobre a atividade ATPásica da Pdr5p foi a chalcona R36, que demonstrou um efeito apenas mediano para a inibição do efluxo de rodamina 6G nesta concentração já bastante alta. Desta forma, decidimos selecionar apenas uma chalcona de cada série para aprofundar nosso estudo e comparar com os efeitos obtidos para ABCG2. Os compostos selecionados apresentaram IC₅₀ para a inibição do transporte de rodamina 6G de 233,73±5,96, 40,80±6,09, e 28,72±8,82 µM, para L2, R32 E HA4, respectivamente. Esses compostos foram, portanto, escolhidos para servir como protótipo para a produção de novas chalconas que poderão apresentar um efeito inibitório mais interessante sobre a Pdr5p de *S. cerevisiae*, a serem testadas posteriormente.

Algumas chalconas já foram anteriormente descritas como inibidores da proteína ABCG2. HAN e colaboradores (2008) demonstraram para uma série de 17 compostos (com substituições 2,4 dimetoxi ou 2,4 dihidroxi no anel A e halogenados no anel B - ver modelo na Figura 7), que existem alguns substituintes que trazem um aumento do potencial inibitório para esta classe de compostos. Para a série estudada em nosso trabalho, pudemos detectar efeitos semelhantes, como é o caso do composto R5, que apresenta o padrão de metoxilação no anel A (2,4-dimetoxi).

O padrão de halogenação do anel B também foi estudado, com compostos como L23, R13 e R25, que são monohalogenados na posição 2' ou 3', apresentando efeitos importantes sobre a ABCG2. Entretanto, para alguns compostos da série L (L3 e L20), esse efeito não foi mantido, o que pode ser explicado pelo anel adicional ligado ao anel A, que promoveria uma interação com o sítio de ligação da proteína diferente daquela realizada pelos compostos estudados no trabalho de HAN e colaboradores (2008). Dos outros padrões

de halogenação estudados, e o único que apresentou um efeito positivo foi o do composto R12, de 2', 6'-dicloro. Entretanto, a presença do cloro na posição 6' pode não trazer nenhum efeito adicional àquele mostrado para as monossubstituições descritas anteriormente.

O padrão de metoxilação no anel B não foi explorado no trabalho de HAN e colaboradores (2008). De maneira geral, nossos resultados demonstraram que a adição de grupamentos metoxila, que aumentam a hidrofobicidade da molécula, trazem efeitos positivos para a inibição da ABCG2. O único composto que não apresentou esse efeito foi o L8, com uma única substituição na posição 4'. Por outro lado, seu equivalente da série R, o R17, apresentou um poder de inibição semelhante ao do inibidor de referência, o GF120918.

Este mesmo efeito foi observado para o grupamento NO₂, que, para as duas séries, na posição 4' não mostrou qualquer efeito, porém, para a série R, somente na posição 3' (R17), demonstrou um efeito semelhante ao GF120918. A diferença no comportamento de compostos com o mesmo padrão de substituição das séries L e R poderia ser explicada pela diferença dos anéis ligados ao anel A, que, no caso da série L, apresenta dois átomos de oxigênio, trazendo um efeito bastante diferente daquele observado para o da série R, uma naftila, que poderia ser responsável por promover um efeito hidrofóbico mais próximo das metoxilas encontradas nas posições 2 e 4 das chalconas do trabalho de HAN e colaboradores de 2008. Além disso, esses efeitos contraditórios podem também ser atribuídos a uma característica importante das chalconas, de serem moléculas flexíveis, caso diferente, por exemplo, dos flavonóides, que são planares e, portanto, rígidas. Por esta razão, as interações entre as chalconas e os seus sítios de ligação são de previsão mais complicada.

A presença de substituintes aromáticos no anel B também promoveu efeitos interessantes. Pudemos observar que o efeito dos anéis presentes nos compostos L15 e R28 não foi tão importante quanto o dos anéis presentes nos compostos L16 e R29, além de alguns compostos da série H (H16, HA4 e HA32). O radical *O*-benzila também promoveu um efeito bastante positivo para esta classe de compostos, como pode ser observado para os compostos L28, R45 e R46.

Os valores de IC₅₀ para a ABCG2 demonstraram que alguns desses inibidores apresentam uma afinidade pela proteína semelhante ou maior que a do GF120918, que apresenta IC₅₀ de 0,3 µM para a linhagem de células utilizada (dados não mostrados). É interessante ressaltar que, para a série H, a adição à estrutura de duas metoxilas resultou em uma afinidade muito maior pelo transportador, levando o IC₅₀ do composto que apresentava apenas a hidroxila no anel A na posição 3 de 0,78 ± 0,19 µM (HA4) para 0,27 ± 0,07 µM (HA32) quando estas foram adicionadas nas posições 4 e 6 do anel A.

Nos experimentos de sensibilização à mitoxantrona pelas chalconas, observamos um efeito reversor do fenótipo de MDR. O efeito de sensibilização à mitoxantrona pela chalcona HA32 foi praticamente completo, ou seja, o valor do IC₅₀ para as células resistentes na presença deste composto ficou bastante próximo daquele observado para as células sensíveis. Entretanto, para L29 e R45, o efeito foi apenas parcial, uma vez que a redução do IC₅₀ existiu, porém os valores obtidos na presença desses dois compostos foram intermediários entre os das duas linhagens utilizadas. Esta incapacidade de manter o efeito obtido com 1 h de incubação por essas chalconas no experimento de 72 h poderia ser atribuída a uma metabolização dos mesmos, o que pode ter limitado seu efeito em um período mais longo de tempo. Para a produção de novas séries de chalconas, este fator

deverá ser avaliado, sintetizando-se compostos que possam ser mais resistentes à metabolização.

A chalcona L29 mostrou ser a mais citotóxica para a linhagem de células HEK-293 das três chalconas utilizadas, seguida pela HA32. Entretanto, pudemos observar que a chalcona R45 aparenta apresentar uma toxicidade bastante baixa para as células. Por não haver diferença entre as linhagens resistente e sensível, nos três casos, poderíamos dizer que as chalconas das três séries testadas não são substratos para a própria bomba de efluxo. Para compostos que são substratos para ABCG2, as células da linhagem HEK-293*pcDNA3ABCG2* sobrevivem em concentrações mais altas que as células da linhagem HEK-293*pcDNA3*, pois os compostos são mantidos em baixa concentração no interior celular.

Como as chalconas deste estudo aparentam ser inibidores não-competitivos para o sítio de transporte de mitoxantrona e também não são substratos para essa proteína (como foi observado nos testes de citotoxicidade), uma das hipóteses possíveis seria a de que as mesmas produziram sua inibição através de uma interação com o domínio citoplasmático da proteína. Dois trabalhos descrevem as interações de chalconas com uma região citoplasmática da P-gp, que faz parte do NBD2 dessa proteína (BOIS *et al.*, 1998; BOIS *et al.*, 1999). Entretanto, esse efeito parece não ser compatível com ABCG2 e as chalconas utilizadas neste estudo, uma vez que os efeitos das chalconas sobre a atividade ATPásica da ABCG2 foram leves. Além disso, os compostos de maior atividade deste estudo têm caráter hidrofóbico, o que dificultaria a interação como domínios citoplasmáticos. O sítio de ligação não é conhecido, porém o fato desses inibidores serem específicos para ABCG2 pode indicar que eles se liguem a uma região exclusiva desse transportador, a ser investigada posteriormente.

Como conclusão deste trabalho, podemos dizer que os derivados do ácido gálico são bons inibidores para a Pdr5p de *S. cerevisiae*, com a possibilidade de produzirem um efeito sinérgico com antifúngicos já existentes, utilizados normalmente na clínica médica, e serem utilizados como modelo para a produção de inibidores eficazes para transportadores MDR de fungos. Além disso, esses mesmos compostos não demonstraram ser bons inibidores para ABCG2 por não possuírem os requisitos básicos para apresentar afinidade por esta proteína, sobretudo o tamanho e a presença de metoxilas, hipótese que foi confirmada pelo fato de o 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila ter se mostrado um inibidor para a ABCG2, mesmo que com baixa afinidade. Já as chalconas estudadas neste trabalho apresentam baixa afinidade para a Pdr5p, podendo ser utilizadas como um protótipo de inibidores para a mesma, cuja estrutura deve sofrer modificações de acordo com os requisitos já descritos na literatura (Golin *et al.*, 2007a), levando a inibidores mais potentes, eficazes, e específicos para esta proteína, que poderiam ser testados também em transportadores homólogos de fungos patogênicos.

Para ABCG2, obtivemos resultados interessantes, com inibidores de IC₅₀ baixos, que se mostraram específicos para ABCG2, e de mecanismo de inibição diferente do descrito normalmente para transportadores ABC, o que os torna potenciais ferramentas para o entendimento do funcionamento dessa proteína e podem levar a drogas realmente eficazes que possam contribuir com o funcionamento dos tratamentos quimioterápicos já disponíveis.

6. CONCLUSÕES

- Os galatos de decila e dodecila se mostraram eficientes como inibidores da Pdr5p, com a habilidade não apenas de inibir a atividade ATPásica de maneira competitiva, mas também inibindo o acúmulo de rodamina 6G por células intactas;
- Os derivados do ácido gálico demonstraram não ser bons inibidores para ABCG2;
- As chalconas utilizadas neste trabalho não se mostraram bons inibidores para a Pdr5p;
- Para ABCG2, os requisitos necessários para que estes compostos sejam bons inibidores foram estabelecidos, como tamanho, presença de substituintes cíclicos e hidrofóbicos;
- As chalconas utilizadas neste trabalho demonstraram ser inibidores potentes para uma primeira geração, com valores de IC₅₀ baixos, melhores que o valor apresentado pelo inibidor de referência utilizado, o GF120918;
- As chalconas utilizadas neste trabalho não apresentaram qualquer efeito sobre os transportadores ABC P-gp e MRP1, o que os torna inibidores específicos para ABCG2;
- As chalconas utilizadas neste trabalho não tiveram nenhum efeito sobre a atividade ATPásica dessa proteína, aparentam ser capazes de inibir não-competitivamente o transporte pela mesma e mostraram-se hábeis na reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas *in vitro*.

- As chalconas das três séries testadas não são substratos para o transportador ABCG2 e devem se ligar a uma região capaz de modular o funcionamento da mesma, porém não envolvida no transporte de substrato, nem na hidrólise de nucleotídeos.

7. PERSPECTIVAS

- Verificar o efeito dos galatos de decila sobre transportadores co-expressos em *S. cerevisiae* para verificar sua especificidade;
- Verificar o efeito dos galatos de decila sobre transportadores homólogos à Pdr5p encontrados em fungos patogênicos, como *C. albicans* e *C. glabrata*;
- Avaliar o efeito desses inibidores sobre cepas de fungos patogênicos resistentes a antifúngicos, isoladas de pacientes;
- Identificar a região de ligação das chalconas a ABCG2;
- A partir dos dados obtidos neste trabalho, com o auxílio de softwares de modelagem molecular, construir um farmacóforo para ABCG2 e a partir desses, sintetizar uma série de chalconas mais potentes.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, J.D.; VAN LOEVEZIJN, A.; LAKHAI, J.M.; VAN DER VALK, M.; VAN TELLINGEN, O.; REID, G., SCHELLENS, J.H.; KOOMEN, G.J. & SCHINKEL, A.H. 2002. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter *in vitro* and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol. Cancer. Ther.* **1**:417-425.
- ALLIKMETS, R.; SCHRIML, L.M.; HUTCHINSON, A.; ROMANO-SPICA, V. & DEAN, M. A., 1998. Human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer. Res.* **58**:5337-5339.
- ALTENBERG, A. G. 2003. The engine of ABC proteins. *News Physiol. Sci.* **18**:191-195.
- ALTENBERG, G. A., VANOYE, C. G., HORTON, J. K., & REUSS, L. 1994. Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug resistant cells: evidence against direct extrusion from the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4654-4657.
- AMBUDKAR, S.V. & SAUNA, Z.E. 2007. About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Biochemistry.* **46**:13109-13119.
- AYRTON, A. & MORGAN, P. 2001. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica*, **31**:469-497.

- BALZI, E., WANG, M., LETERNE, S., CAPIEAUX, E. & GOFFEAU, A. 1994. PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *J. Biol. Chem.* **269**:2206-2214.
- BERGER, E. A. & HEPPEL, L. A. 1974. Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **249**:7747-7755.
- BISSINGER, P. H. & KUCHLER, K. 1994. Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* STS1 gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance. *J. Biol. Chem.* **269**:4180-4186.
- BOIS, F.; BENEY, C.; BOUMENDJEL, A.; MARIOTTE, A.M. CONSEIL, G. & DI PIETRO, A. 1998. Halogenated Chalcones with High-Affinity Binding to P-Glycoprotein: Potential Modulators of Multidrug Resistance. *J. Med. Chem.* **41**:4161-4164.
- BOIS, F.; BOUMENDJEL, A.; MARIOTTE, A.M.; CONSEIL, G. & DI PIETRO, A. 1999. Synthesis and biological activity of 4-alkoxy chalcones: potential hydrophobic modulators of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **7**:2691-2695
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

- BURGER, H. & NOOTER, K. 2004. Pharmacokinetic resistance to imatinib mesylate: role of the ABC drug pumps ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) in the oral bioavailability of imatinib. *Cell Cycle* **3**:1502 -1505.
- CANNON, R.D.; LAMPING, E.; HOLMES, A.R NIIMI, K. BARET, P.V., KENIYA, M.V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A. & MONK, B.C. 2009. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**:291-321.
- CHIFFLET, S., TORRIGLIA, A., CHIESA, R., TOLOSA, S. 1988. A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPases. *Anal. Biochem.* **168**:1-4.
- CLARK, R.; KERR, I. & CALLAGHAN, R. 2006. Multiple drug binding sites on the R482G isoform of the ABCG2 transporter. *Br. J. Pharmacol.* **149**:506–515.
- CONSEIL, G.; BAUBICHON-CORTAY, H.; DAYAN, G.; JAULT, J.M.; BARRON, D. & DI PIETRO, A. 1998. Flavonoids: A class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**: 9831–9836.
- CONSEIL, G., DECOTTIGNIES, A., JAULT, J.M., COMTE, G., BARRON, D. GOFFEAU, A. & DI PIETRO, A. 2000. Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **39**:6910-6917.

- CONSEIL, G., PEREZ-VICTORIA, J. M., JAULT, J. M., GAMARRO, F., GOFFEAU, A., HOFFMANN, J. & DI PIETRO, A. 2001. Protein kinase C effectors bind to multidrug ABC transporters and inhibit their activity. *Biochemistry* **40**:2564-2571.
- CONSEIL, G., PEREZ-VICTORIA, J.M., RENOIR, J.M., GOFFEAU, A. & DI PIETRO, A. 2003. Potent competitive inhibition of drug binding to the *Saccharomyces cerevisiae* ABC exporter Pdr5p by the hydrophobic estradiol-derivative RU49953. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**:131-134.
- COORAY, H.C.; BLACKMORE, C.G.; MASKELL, L. & BARRAND, M.A. 2002. Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport* **13**: 2059-2063.
- DE BRUIN, M.; MIYAKE, K.; LITMAN, T.; ROBNEY, R. & BATES, S.E. 1999. Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett.* **146**:117-126.
- DEAN, M.; HAMON, Y. & CHIMINI, G. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* **42**:1007 –1017.
- DECOTTIGNIES, A. & GOFFEAU, A. 1997. Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Genet.* **15**:137-145.
- DECOTTIGNIES, A., GRANT, A.M., NICHOLS, J.W., DE WET, H., MCINTOSH, D.B. & GOFFEAU, A. 1998. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J. Biol. Chem.* **273**:12612-12622.

- DECOTTIGNIES, A., KOLACZKOWSKI, M., BALZI, E. & GOFFEAU, A., 1994. Solubilization and characterization of the overexpressed PDR5 multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast. *J. Biol. Chem.* **269**:12797-12803.
- DECOTTIGNIES, A., ROGERS, B., KOLACZKOWSKI, M., CARVAJAL, E., BALZI, E., CONSEIL, G., NIIMI, K., DI PIETRO, A., MONK, B. C. & GOFFEAU, A. 2001. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Microbial multidrug efflux*, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- DEL SORBO, G., SCHOONBEEK, H. & DE WAARD, M. A. 2000. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet. Biol.* **30**:1-15.
- DEY, S.; RAMACHANDRA, M.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M.M. & AMBUDKAR, S.V. 1998. Photoaffinity labeling of human P-glycoprotein: effect of modulator interaction and ATP hydrolysis on substrate binding. *Methods Enzymol.* **292**:318–328.
- DIESTRA, J.E.; SCHEFFER, G.L.; CATALA, I.; MALIEPAARD, M.; SCHELLENS, J.H.; SCHEPER, R.J.; GERMÀ-LLUCH, J.R. & IZQUIERDO, M.A. 2002. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J. Pathol.* **198**:213-219.
- DI PIETRO, A., CONSEIL, G., PÉREZ-VICTORIA, J.M., DAYAN, G., BAUBICHON-CORTAY, H., TROMPIER, D., STEINFELS, E., JAULT, J.M., DE WET, H., MAITREJEAN, M., COMTE, G., BOUMENDJEL, A., MARIOTTE, A.-M., DUMONTET, C., MCINTOSH, D. B., GOFFEAU, A., CASTANYS, S., GAMARRO, F. & BARRON, D. 2002. Modulation by flavonoids of cell

multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cell Mol. Life Sci.* **59**:307–322.

DODO, K.; MINATO, T.; NOGUCHI-YACHIDE, T.; SUGANUMA, M. & HASHIMOTO, Y. 2008. Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of alkyl gallate and gallamide derivatives related to (-)-epigallocatechin gallate. *Bioorg. Med. Chem.* **16**:7975-7982.

DOYLE, L.A.; YANG, W.; ABRUZZO, L.V.; KROGMANN, T.; GAO, Y.; RISHI, A.K. & ROSS, D.D. 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:15665-15670.

DULLEY, J. 1965. Determination of inorganic phosphate in the presence of detergents or protein. *Anal. Biochem.* **67**:91-96.

EGNER, R., ROSENTHAL, F.E., KRALLI, A., SANGLARD, D. & KUCHLER, K. 1998. Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter. *Mol. Biol. Cell* **9**:523-543.

EGNER, R.; BAUER, B.E. & KUCHLER, K. 2000. The transmembrane domain 10 of the yeast Pdr5p ABC antifungal efflux pump determines both substrate specificity and inhibitor susceptibility. *Mol Microbiol.* **35**:1255-1263.

ELKIND, N.B.; SZENTPETERY, Z.; APATI, A.; OZVEGY-LACZKA, C.; VÁRADY, G.; UJHELLY, O.; SZABÓ, K.; HOMOLYA, L.; VÁRADI, A.; BUDAY, L.; KÉRI, G.; NÉMET, K. & SARKADI, B. 2005. Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced

- by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, gefitinib). *Cancer Res.* **65**: 1770-1777.
- ENDICOTT, J.A. & LING, V. 1989. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:137-71.
- ERNST, R.; KUEPPERS, P.; KLEIN C.M., SCHWARZMUELLER T.; KUCHLER, K. & SCHMITT, L. 2008. A mutation of the H-loop selectively affects rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **105**:5069–5074.
- FERREIRA-PEREIRA, A., MARCO, S., DECOTTIGNIES, A., NADER, J., GOFFEAU, A., & RIGAUD, J.L. 2003. Three-dimensional reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. *J. Biol. Chem.* **278**:11995–11999.
- FISKE, C. H. & SUBBAROW, Y. J. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**:375-400.
- FIUZA, S.M.; GOMES, C.; TEIXEIRA, L.J.; GIRAO DA CRUZ, M.T.; CORDEIRO, M.N.; MILHAZES, N.; BORGES, F. & MARQUES, M.P. 2004. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties - a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorg. Med. Chem.* **12**:3581-3589.
- FREY, C.; PAVANI, M.; CORDANO, G.; MUÑOZ, S.; RIVERA, E.; MEDINA, J.; MORELLO, A.; DIEGO MAYA, J.; FERREIRA, J. 2007. Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **146**:520-527.

- FUJITA, K. & KUBO, I. 2002. Antifungal activity of octyl gallate. *Int J. Food Microbiol.* **79**:193-201.
- GOFFEAU, A. & DUFOUR, J.P. 1988. Plasma membrane ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **157**:528-533.
- GOLIN, J., AMBUDKAR, S.V., GOTTESSMAN, M., HABIB, A.D., SCZEPANSKI, J., ZICCARDI, W., MAY, L. 2003. Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate strong size dependence for xenobiotic efflux, *J. Biol. Chem.* **278**:5963–5969.
- GOLIN, J., BARKATT, A., CRONIN, S., ENG, G. & MAY, L. 2000. Chemical specificity of the PDR5 multidrug resistance gene product of *Saccharomyces cerevisiae* based on studies with tri-*n*-alkyltin chlorides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:134-138.
- GOLIN, J.; AMBUDKAR, S.V. & MAY, L. 2007a. The yeast Pdr5p multidrug transporter: How does it recognize so many substrates? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**:1-5.
- GOLIN, J.; KON, Z.N.; WU, C.P.; MARTELLO, J.; HANSON, L.; SUPERNAVAGE, S.; AMBUDKAR, S.V. & SAUNA, Z.E. 2007b. Complete Inhibition of the Pdr5p Multidrug Efflux Pump ATPase Activity by Its Transport Substrate Clotrimazole Suggests that GTP as Well as ATP May Be Used as an Energy Source. *Biochemistry* **46**:13109-13119.
- GOTTESSMAN, M.M. & PASTAN, I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:385-427.

- GROS, P., CROOP J.& HOUSMAN D. 1986. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicating strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* **47**:371–380.
- HAN, Y.; RIWANTO, M.; GO, M.L. & RACHEL, EE, P.L. 2008. Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) by non-basic chalcone analogues. *Eur. J. Pharm. Sci.* **35**:30-41.
- HIGGINS, C. F. & GOTTESMAN. M. M. 1992. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem. Sci.* **17**:18-21.
- HIGGINS, C. F. 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **446**:749-757.
- HIGGINS, C. F., HILES, I. D., SALMOND, G. P. C., GILL, D. R., DOWNIE, J. A., EVANS, I. J., HOLLAND, B., GRAY, L., BUCKEL, S. D., BELL, A. W. & HERMODSON, M. A. 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**:448–450.
- HIGGINS, C. F.; HAAG, P. D.; NIKAIDO, K.; ARDESHIR, F.; GARCIA, G. & FERRO-LUZZI AMES, G. 1982. Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*, *Nature* **298**:723-727.
- HIGGINS, C.F. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res. Microbiol.* **152**:205-210.

- HLAVÁČEK, O.; KUCEROVÁ, H.; HARANT, K.; PALKOVÁ, Z. & VÁCHOVÁ, L. 2009. Putative role for ABC multidrug exporters in yeast quorum sensing. *FEBS Lett.* **583**:1107-1113.
- HONJO, Y.; HRYCYNA, C.A.; YAN, Q.W.; MEDINA-PEREZ, W.Y.; ROBEY, R.W.; VAN DE LAAR, A. LITMAN, T.; DEAN, M. & BATES, S.E. 2001. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.* **61**: 6635–6639.
- HURTADO C, BUSTOS MJ, SABINA P, NOGAL ML, GRANJA AG, GONZÁLEZ ME, GÓNZALEZ-PORQUÉ P, REVILLA Y, CARRASCOSA AL. 2008. Antiviral activity of lauryl gallate against animal viruses. *Antivir. Ther.* **13**:909-917.
- HYDE, S. C., EMSLEY, P., HASTHORN, M. J., MIMMACK, M. M., GILEADI, U., PEARCE, S. R., GALLAGHER, M. P., GILL, D. R., HUBBARD, R. E. & HIGGINS, C. F. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**:362-365.
- IVANOVA, A.; BATOVSKA, D.; ENGI, H.; PARUSHEV, S.; OCSOVSZKI, I.; KOSTOVA, I. & MOLNAR, J. 2008. MDR-reversal activity of chalcones. *In Vivo.* **22**:379-384.
- JONKER, J.W.; BUITELAAR, M.; WAGENAAR, E.; VAN DE VALK, M.A.; SCHEFFER, G.L.; SCHEPER, R.J.; PLOSCHE, T.; KUIPERS, F.; ELFERINK, R.P.; ROSING, H.; BEIJNEN, J.H. & SCHINKEL, A.H. 2002. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:15649–15654.

- JONKER, J.W.; MERINO, G.; MUSTERS, S.; VAN HERWAARDEN, A.E.; BOLSCHER, E.; WAGENAAR, E.; MESMAN, E.; DALE, T.C. & SCHINKEL, A.H. 2005. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat. Med.* **11**:127-129.
- JONKER, J.W.; SMIT, J.W.; BRINKHUIS, R.F.; MALIEPAARD, M.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H. & SCHINKEL, A.H. 2000. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**:1651 -1656.
- KITAGAWA, S.; NABEKURA, T.; KAMIYAMA, S.; TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, Y.; KASHIWADA, Y. & IKESHIRO, Y. 2005. Effects of alkyl gallates on P-glycoprotein function. *Biochem. Pharmacol.* **70**:1262-1266.
- KOLACZKOWSKA, A. & GOFFEAU, A. 1999. Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist. Updates* **2**:403-414.
- KOLACZKOWSKA, A.; KOLACZKOWSKI, M.; GOFFEAU, A. & MOYE-ROWLEY, W. S. 2008. Compensatory activation of the multidrug transporters Pdr5p, Snq2p, and Yor1p by Pdr1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **582**:977-983.
- KOLACZKOWSKI, M., KOLACZKOWSKA, A., LUCZYNSKI, J. WITEK, S., & GOFFEAU, A. 1998. In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb. Drug Resist.* **4**:143-158.

- KOLACZKOWSKI, M., VAN DER REST, M., CYBULARZ-KOLACZKOWSKA, A., SOUMILLION, J. P., KONINGS, W. N. & GOFFEAU, A. 1996. Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J. Biol. Chem.* **271**:31543-31548.
- KRATZ, J.M.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; KOLLING, D.J.; LEAL, P.C.; CIRNE-SANTOS, C.C.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J.; TRYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; FRUGULHETTI, I.C.; BARARDI, C.R. & SIMÕES, C.M. 2008. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **103**:437-442.
- KRISHNAMURTHY, P.; XIE, T. & SCHUETZ, J.D. 2007. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol. Ther.*; **114**:345 -358.
- KUBO, I.; XIAO, P. & FUJITA, K. 2001. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. *Bioorg. Med. Chem. Lett.***11**:347-350.
- KUBO, I.; XIAO, P.; NIHEI, K.; FUJITA, K.; YAMAGIWA, Y. & KAMIKAWA, T. J. Molecular design of antifungal agents. *Agric. Food. Chem.* 2002, **50**: 3992-3998.
- KUCHLER, K., STERNE, R. E. & THORNER, J. 1989. *Saccharomyces cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO J.* **8**:3973-3984.
- KÜHNLE, M.; EGGER, M.; MÜLLER, C.; MAHRINGER, A.; BERNHARDT, G.; FRICKER, G.; KÖNIG, B. & BUSCHAUER A. 2009. Potent and Selective Inhibitors of Breast Cancer

Resistance Protein (ABCG2) Derived from the p-Glycoprotein (ABCB1) Modulator

Tariquidar. *J. Med. Chem.* **52**:1190–1197.

LAGE H. 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem *Cell.*

Mol. Life Sci. **65**:3145-3167.

LAGE, H. 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to

human cancers. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:188-99.

LEAL, P.C.; MASCARELLO, A.; DERITA, M.; ZULJAN, F.; NUNES, R.J.; ZACCHINO, S. &

YUNES, R.A. 2009. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal

activity against yeasts and filamentous fungi. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**:1793-

1796.

LEONARD, P.; RATHOD, P. & GOLIN, J. 1994. Loss-of-function mutation in the yeast

multiple drug resistance gene PDR5 causes a reduction in chloramphenicol efflux,

Antimicrob. Agents Chemother. **38**:2492-2494.

LEPPERT, G.; MCDEVITT, R.; FALCO, S.C.; VAN DYK, T.; FICKE, M. & GOLIN, J. 1990.

Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in

Saccharomyces. *Genetics* **125**:13-20.

LITMAN, T.; BRANGI, M.; HUDSON, E.; FETSCH, P.; ABATI, A.; ROSS, D.D.; MIYAKE, K.;

RESAU, J.H. & BATES, S.E. 2000. The multidrug-resistant phenotype associated with

overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J. Cell. Sci.*

113:2011–2021.

- LITMAN, T.; DRULEY, T.E.; STEINC, W.D. & BATES, S.E. 2001. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**:931-959.
- LIU, M.; WILAIRAT, P. & GO, M.L. 2001. Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones: structure-activity relationship analysis. *J. Med. Chem.* **44**:4443-4452.
- LIU, X.L. & GO, M.L. 2006. Antiproliferative properties of piperidinylchalcones. *Bioorg. Med. Chem.* **14**:153-163.
- LIU, X.L.; TEE, H.W. & GO, M.L. 2008. Functionalized chalcones as selective inhibitors of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. *Bioorg Med Chem.* **16**:171-180.
- LU, Z.; NIE, G.; BELTON, P.S.; TANG, H. & ZHAO, B. 2006. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochem. Internat.* **48**:263-274.
- MAHÉ, Y., LEMOINE, Y. & KUCHLER, K. 1996. The ATP binding cassette transporter Pdr5 and Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **271**:25167-25172.
- MAMNUN, Y.O.; SCHÜLLER, C. & KUCHLER, K. 2004. Expression regulation of the yeast PDR5 ATP-binding cassette (ABC) transporter suggests a role in cellular detoxification during the exponential growth phase. *FEBS Lett.* **559**:111-117.

- MASAKI, H.; OKAMOTO, N.; SAKAKI, S.; & SAKURAI, H. 1997. Protective effects of hydroxybenzoic acids and their esters on cell damage induced by hydroxyl radicals and hydrogen peroxides. *Biol. Pharm. Bull.* **20**:304-308.
- MCDEVITT, C. A. & CALLAGHAN, R. 2007. How can we best use structural information on P-glycoprotein to design inhibitors? *Pharmacol. Ther.* **113**:429-441.
- MCDEVITT, C.A.; COLLINS, R.F.; CONWAY, M.; MODOK, S.; STORM, J.; KERR, I.D.; FORD, R.C. & CALLAGHAN, R. 2006. Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* **14**:1623-1632.
- MERINO, G.; ALVAREZ, A.I.; PULIDO, M.M.; MOLINA, A.J.; SCHINKEL, A.H. & PRIETO, J.G. 2006. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics and milk secretion. *Drug Metab. Dispos.* **34**:690 -695.
- MERINO, G.; JONKER, J.W.; WAGENAAR, E.; VAN HERWAARDEN, A.E. & SCHINKEL, A.H. 2005. The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol. Pharmacol.* **67**:1758-1764.
- MIMMACK, M. L., GALLAGHER, M. P., HYDE, S. C., PEARCE, S. R., BOOTH, I. R. & HIGGINS, C. F. 1989. Energy-coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: stoichiometry of ATP hydrolysis during transport. *Proc. Natl. Acad. USA* **86**:8257-8261.

- MIWA, M.; TSUKAHARA, S.; ISHIKAWA, E.; ASADA, S.; IMAI, Y. & SUGIMOTO, Y. 2003. Single amino acid substitutions in the transmembrane domain of breast cancer resistance protein (BCRP) alter cross resistance patterns in the transfectants. *Int. J. Cancer* **107**:757-767.
- MIYAKE, K.; MICKLEY, L.; LITMAN, T.; ZHAN, Z.; ROBNEY, R.; CRISTENSEN, B.; BRANGI, M.; GREENBERGER, L.; DEAN, M.; FOJO, T. & BATES, S.E. 1999. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* **59**:8-13.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**:55-63.
- NIIMI, K.; HARDING, D.R.K.; PARSHOT, R.; KING, A.; LUN, D.J.; DECOTTIGNIES, A.; NIIMI, M.; LIN, S.; CANNON, R.D.; GOFFEAU, A. & MONK, B. C. 2004. Chemosensitization of fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and pathogenic fungi by a D-octapeptide derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1256-1271.
- OZVEGY-LACZKA, C.; KOBLOS, G.; SARKADI, B. & VARADI, A. 2005. Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: major differences in transport capacity and substrate recognition. *Biochim. Biophys. Acta* **1668**: 53–63.
- PEER, D. & MARGALIT, R. 2006. Fluoxetine and reversal of multidrug resistance. *Cancer Lett.* **237**:180-187.
- POLGAR, O.; ROBNEY, R.W. & BATES, S.E. 2008. ABCG2: structure, function and role in drug response *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4:1-15.

- PUTMAN, M.; VAN VEEN, H.W. & KONINGS, W.N. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:672-693.
- RABINDRAN, S.K.; ROSS, D.D.; DOYLE, L.A.; YANG, W. & GREENBERGER, L.M. 2000. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* **60**:47-50.
- RANGEL, L.P.; ABREU, L.F.; ANDRADE, A.R.; LEITÃO, S.G.; LEITÃO, G.G.; FERREIRA-PEREIRA, A. 2008. Effect of different extracts from the Brazilian Atlantic Forest on the Pdr5p ATPase activity. *Braz. Journal Pharmacogn.* **18**:30-36.
- RAVIV, Y.; POLLARD, H. B.; BRUGGEMANN, E. P.; PASTAN, I. & GOTTESMAN, M. M. 1990. Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *J. Biol. Chem.* **265**:3975-3980.
- ROBEY, R.W.; FETSCH, P.A.; POLGAR, O., DEAN & M; BATES, S.E. 2006. The livestock photosensitizer, phytoporphyrin (phylloerythrin), is a substrate of the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Res. Vet. Sci.* **81**:345-349.
- ROBEY, R.W.; MEDINA-PEREZ, W.Y.; NISHIYAMA, K.; LAHUSEN, T.; MIYAKE, K.; LITMAN, T.; SENDEROWICZ, A.M.; ROSS, D.D. & BATES, S.E. 2001. Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clin. Cancer. Res.* **7**:145-152.
- ROBEY, R.W.; STEADMAN, K.; POLGAR, O.; MORISAKI, K.; BLAYNEY, M.; MISTRY, P. & BATES, S.E. 2004. Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res.* **64**:1242 –1246.

- ROGERS, B.; DECOTTIGNIES, A.; KOLACZKOWSKI, M.; CARAVAJAL, E.; MOYE-ROWLEY W.S. & GOFFEAU, A. 2001. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **3**:207-214.
- RONINSON, I. B., CHIN, J. E., CHOI, K. G., *et al.* (1986) Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistance KB carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**:4538-4542.
- ROSS, D.D.; KARP, J.E.; CHEN, T.T. & DOYLE, L.A. 2000. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. Blood 96: 365-368.
- ROSSO, R.; VIEIRA, T.O.; LEAL, P.C.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A. & CRECZYNSKI-PASA, T.B. 2006. Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. Bioorg. Med. Chem., 14:6409-6413.
- SARKADI, B.; PRICE, E.M.; BOUCHER, R.C.; GERMANN, U.A. & SCARBOROUGH, G.A. 1992. Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. J Biol Chem. **267**:4854-4858.
- SAUNA, Z.E.; SMITH, M.M., MULLER, M.; KERR, K.M. & AMBUDKAR, S.V. 2001. The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein. J. Bioenerg. Biomembr. **33**:481-491.
- SCHELLENS, J.H.; MALIEPAARD, M.; SCHEPER, R.J.; SCHEFFER, G.L.; JONKER, J.W.; SMIT, J.W.; BEIJNEN, J.H. & SCHINKEL, A.H. 2000. Transport of topoisomerase I inhibitors

- by the breast cancer resistance protein. Potential clinical implications. *Ann NY Acad. Sci.* **922**:188-194.
- SENIOR, A.E.; AL-SHAWI, K.M. & URBATSCH, I.L. 1995. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett.* **377**:285-289.
- SESINK, A.L.; ARTS, I.C.; DE BOER, V.C.; BREEDVELD, P.; SCHELLENS, J.H.; HOLLMAN, P.C. & RUSSEL, F.G. 2005. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Mol. Pharmacol.* **67**:1999-2006.
- SHUKLA, S.; SANI, P.; SMIRTI, S.; JHA, S.; AMBUDKAR, S.V. & PRASAD, R. 2003. Functional characterization of the *Candida albicans* ABC transporter Cdr1p. *Eukaryotic Cell* **2**:1361-1375.
- STAUD, F. & PAVEK, P. 2005. Breast cancer resistance protein (BCRP/ ABCG2). *Int. J. Biochem Cell Biol.* **37**:720-725.
- STAVROVSKAYA, A.A. & STROMSKAYA, T.P., 2008. Transport Proteins of the ABC Family and Multidrug Resistance of Tumor Cells. *Biochemistry (Moscow)* **73**:592-604.
- SUZUKI, M.; SUZUKI, H.; SUGIMOTO, Y. & SUGIYAMA, Y. 2003. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J. Biol. Chem.* **278**: 22644-22649.
- TAGLICHT, D. & MICHAELIS, S. 1998. *Saccharomyces cerevisiae* ABC proteins and their relevance to human health and disease. *Methods Enzymol.* **292**:130-162.

- TATSUZAKI, J.; BASTOW, K.F.; NAKAGAWA-GOTO, K.; NAKAMURA, S.; ITOKAWA, H. & LEE, K.H. 2006. Dehydrozingerone, chalcone, and isoeugenol analogues as in vitro anticancer agents. *J. Nat. Prod.* **69**:1445-1449.
- THAKUR, J.K.; ARTHANARI, H.; YANG F.; PAN, S.J.; FAN, X.; BREGER, J.; FRUEH, D. P.; GULSHAN, K.; LI, D. K.; MYLONAKIS, E.; STRUHL, K.; MOYE- ROWLEY, W.S.; CORMACK, B. P.; WAGNER, G. & NAAR, A.M. 2008. A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* **452**:604-609.
- TÖRMÄKANGAS, L.; VUORELA, P.; SAARIO, E.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P. & VUORELA, H. 2005. *In vivo* treatment of acute *Chlamydia pneumoniae* infection with the flavonoids quercetin and luteolin and an alkyl gallate, octyl gallate, in a mouse model. *Biochem. Pharmacol.* **70**:1222-1230.
- TOWNSEND, A. & TROWSDALE, J. 1993. The transporters associated with antigen presentation. *Semin. Cell. Biol.* **4**:53-61.
- UOZAKI, M.; YAMASAKI, H.; KATSUYAMA, Y.; HIGUCHI, M.; HIGUTI, T. & KOYAMA, A.H. 2007. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. *Antiviral Res.* **73**:85-91.
- VAN DER KOLK, D.M.; VELLENGA, E.; SCHEFFER, G.L., MÜLLER, M.; BATES, S.E.; SCHEPER, R.J. & DE VRIES, E.G. 2002. Expression and activity of breast cancer resistance protein (BCRP) in *de novo* and relapsed acute myeloid leukemia. *Blood* **99**:3763-3770.

- VAN HERWAARDEN, A.E.; JONKER, J.W.; WAGENAAR, E.; BRINKHUIS, R.F.; SCHELLENS, J.H.M.; BEIJNEN, J.H. & SCHINKEL, A.H. 2003. The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine. *Cancer Res.* **63**:6447-6452.
- VAN HERWAARDEN, A.E.; WAGENAAR, E.; MERINO, G.; JONKER, J.W.; ROSING, H.; BEIJNEN, J.H. & SCHINKEL, A.H. 2007. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol. Cell. Biol.* **27**:1247-1253.
- VARMA, M. V. S., ASHOKRAJ, Y., DEY, C. S. & PANCHAGNULA, R. 2003. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol. Res.* **48**:347–359.
- VOLK, E.L. & SCHNEIDER, E. 2003. Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res.* **63**:5538-5543.
- WALKER, J.E., SARASTE, M., RANSWICK, M.J. & GAY, N.J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**:945-951.
- WOLFGER, H., MAMNUN, Y.M. & KUCHLER, K. 2001. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res. Microbiol.* **152**:375-89.

- WOLFGER, H., MAMNUN, Y.M. & KUHLER, K. 2004. The yeast Pdr15p ATP-binding cassette (ABC) protein is a general stress response factor implicated in cellular detoxification. *Biol. Chem.* **279**:11593-11599.
- XU, J.; LIU, Y.; YANG, Y.; BATES, S. & ZHANG, J.T. 2004. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J. Biol. Chem.* **279**:19781-19789.
- YAMAMOTO, S.; HIRAGA, K.; ABIKO, A.; HAMANAKA, N. & ODA, K. 2005. A new function of isonitrile as an inhibitor of the Pdr5p multidrug ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**:622-628.
- YANESE, K.; TSUKAHARA, S.; ASADA, S.; ISHIKAWA, E.; IMAI, Y. & SUGIMOTO, Y. 2004. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Mol. Cancer Ther.* **3**:1119-1125.
- YANESE, K.; TSUKAHARA, S.; MITSUHASHI, J. & SUGIMOTO, Y. 2005. Functional SNPs of the breast cancer resistance protein; therapeutic effects and inhibitor development. *Cancer Lett.* **234**: 73-80.
- YOUSSEF, K.A.; QAISER, M.Z.; BEGLEY, D.J.; RICE-EVANS, C.A. & ABBOTT, N.J. 2004. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* **36**:592-604.
- ZHELEZNOVA, E.E.; MARKHAM, P.N.; NEYFAKH, A.A. & BRENNAN, R.G. 1999. *Cell*, **96**:353-362.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)