



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MARIA FERNANDA MADRID MENDOZA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO MODULADOR DE RESISTÊNCIA DOS  
ALCALOIDES TROPANOS EB-PA E EB-PB EM CÉLULAS DE CÂNCER DE  
PULMÃO RESISTENTES A QUIMIOTERÁPICOS**

**FORTALEZA**

**2024**

MARIA FERNANDA MADRID MENDOZA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO MODULADOR DE RESISTÊNCIA DOS  
ALCALOIDES TROPANOS EB-PA E EB-PB EM CÉLULAS DE CÂNCER DE  
PULMÃO RESISTENTES A QUIMIOTERÁPICOS**

Tese submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Oncologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Coorientador: Dr. Danilo D. Rocha.

**FORTALEZA**

**2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M157a Madrid Mendoza, Maria Fernanda.

Avaliação do efeito modulador de resistência dos alcaloides tropanos eb-pa e eb-pb em células de câncer de pulmão resistentes a quimioterápicos / Maria Fernanda Madrid Mendoza. – 2024.  
150 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho .

Coorientação: Prof. Dr. Danilo D. Rocha.

1. Erythroxyllum Bezerreae. 2. Multirresistência. 3. Alcaloide tropano. 4. câncer de pulmão. I. Título.

CDD 615.1

---

MARIA FERNANDA MADRID MENDOZA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO MODULADOR DE RESISTÊNCIA DOS  
ALCALOIDES TROPANOS EB-PA E EB-PB EM CÉLULAS DE CÂNCER DE  
PULMÃO RESISTENTES A QUIMIOTERÁPICOS**

Tese submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Oncologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Coorientador: Dr. Danilo D. Rocha.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Raquel Carvalho Montenegro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Bruno Coelho Cavalcanti  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra  
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

---

Prof. Dr. Felipe Pantoja Mesquita  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)



A Deus!

A meu pai e minha mãe que sempre  
foram minha inspiração, fortaleza e suporte!

Meu irmão pelo amor e apoio sempre.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS**, por estar sempre presente em cada processo da minha vida, protegendo-me, dando-me força cada dia para continuar e não desistir dos meus objetivos.

Ao **professor Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho**, por me receber como sua orientanda e me abrir as portas do laboratório me permitindo crescer como pessoa e como profissional durante os 6 anos, impactando a minha de uma forma única. A **professora Dra. Claudia do Ó Pessoa**, por me aceitar no laboratório e me apoiar no desenvolvimento da tese, a ser inspiração para superar obstáculos. Ao **Dr. Danilo D. Rocha**, por ser uma incrível pessoa como coorientador e como amigo, por me ajudar no desenvolvimento do projeto, me dando suporte sempre. Ao professor **Dr. Roberto Cesar Pereira Lima** por me abrir as portas do laboratório e me ajudar desde o começo do mestrado até o doutorado. Ao professor **Washintong Barros** pelo apoio dentro do laboratório.

Ao **meus pais**, por ser as primeiras pessoas que acreditaram em mim, em mi apoiar em todas as decisões, por orar por mim e sem importar a distância sempre estiveram presente em todo o processo. **Aos meus amigos** do laboratório de Oncologia Experimental, especialmente a **Jessica Almeida** em me ajudar no desenvolvimento dos experimentos e pela paciência, amizade. Também a **Nathaly Mendoza** por ser a amiga que fico desde o começo até o final dessa caminhada e que será amiga sempre. A minha amiga **Celia Choquenaira** por me apoiar nos experimentos sem importar o horário, os concelhos e suporte sempre amiga que levarei para toda a vida. Ao **Dr. Bruno Cavalcanti** pelo todo a ajuda e apoio durante o tempo de mestrado e doutorado.

Ao **Dr. Pedro Magalhaes**, por me ajudar desde que eu me apresentei ao programa, pelos seus conselhos e apoio no desenvolvimento do projeto. A **Adelânia Marinho**, por sempre me ajudar desde o primer momento que eu cheguei a Fortaleza e sempre estar disposta me ajudar em todo, pessoa especial de coração único, bondoso, uma amiga especial. A **técnico Silvana França**, pela ajuda dentro do laboratório de oncologia experimental e por ser também uma amiga dentro dele.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES**

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ**

## RESUMO

A multirresistência (MDR) é um fenômeno exibido pelo câncer de pulmão e representa um obstáculo fundamental para tratamentos bem-sucedidos. As células tumorais comumente atingem o fenótipo MDR por meio de superexpressão e/ou aumento da atividade dos transportadores ABC. Os transportadores MDR1, MRP1 e MRP2 são uma das principais causas de MDR e, portanto, são um alvo valioso na reversão do MDR. Nesse contexto, várias gerações de inibidores do transportador de efluxo ABC foram desenvolvidas, no entanto, a maioria deles falhou devido a efeitos adversos graves. Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo biológico *in vitro* resistente a cisplatina a partir da linhagem parental A549 para triagem de compostos moduladores de resistência e avaliar os efeitos moduladores MDR dos alcaloides tropanos (EB-PA e EB-PB) isolados da espécie *Erythroxylum Bezerreae* em combinação com cisplatina frente a uma linhagem celular resistente de câncer de pulmão (A549DDP20). O modelo biológico desenvolvido A549DDP20 apresenta fenótipo de resistência a múltiplos fármacos mostrando resistência cruzada a doxorubicina e paclitaxel superexpressão das proteínas MDR1, MRP1 e MRP2, e mostrando alterações no perfil citogenético após o término de indução de resistência. A cisplatina, quando tratado isoladamente, apresentaram  $IC_{50}$  de  $171,30\mu M$  e  $10,62\mu M$  nas linhagens A549DDP20 e A549 respectivamente. Além disso, observou-se que EB-PA apresentou efeito médio de modulação de resistência após 3 e 24 horas de tratamento, porém EB-PB apresentou efeito de modulação baixo. Dessa forma, a combinação obtida com o software CompuSym da EB-PA e cisplatina, observou-se valores de índice de combinação  $<1$ , mostrando um efeito sinérgico. Existe a possibilidade que esta potencialização de cisplatina se deva, ao princípio, ao bloqueio de bombas de efluxo relacionada ao MDR pela EB-PA. Foram testadas 7 diferentes combinações (DDP  $10\mu M$ + Ver  $10\mu M$ , DDP  $10\mu M$ + Ver  $20\mu M$ , DDP  $20\mu M$ + Ver  $20\mu M$ , DDP  $10\mu M$ + EB-PA  $5\mu M$ , DDP  $10\mu M$ + EB-PA  $10\mu M$ , DDP  $10\mu M$ + EB-PA  $37\mu M$  e DDP  $20\mu M$ + EB-PA  $37\mu M$ ) observando a redução da viabilidade, densidade celular, diminuição na formação de colônias e aumento da proteína pro-apoptótica BAX na presença de EB-PA e cisplatina. Além disso, observou-se que EB-PA não afeta a expressão das proteínas MDR1, MRP1 e MRP2 de forma isolada ou em combinação. Resultados de ensaios *in silico* mostraram a interação em sítios de ligação de ATP na proteína MDR1 e na proteína MRP1 interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio de EB-PA e EB-PB.

**Palavras-chave:** *Erythroxylum Bezerreae*; Multirresistência; Alcaloide tropano, câncer de pulmão

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE RESISTANCE MODULATING EFFECT OF TROPANE ALKALOIDS EB-PA AND EB-PB ON CHEMOTHERAPY RESISTANT LUNG CANCER CELLS

Multidrug resistance (MDR) is a phenomenon exhibited by lung cancer and represents a fundamental obstacle to successful treatments. Tumor cells commonly achieve the MDR phenotype through overexpression and/or increased activity of ABC transporters. The MDR1, MRP1, and MRP2 transporters are a major cause of MDR and are therefore a valuable target in reversing MDR. In this context, several generations of ABC efflux transporter inhibitors have been developed, however, most of them have failed due to serious adverse effects. Considering the above, the objective of this work was to develop an in vitro biological model resistant to cisplatin from the parental line A549 to screen resistance modulating compounds and evaluate the MDR modulating effects of isolated tropane alkaloids (EB-PA and EB-PB). of the species *Erythroxylum Bezerreae* in combination with cisplatin against a resistant lung cancer cell line (A549DDP20). The developed biological model A549DDP20 presents a multidrug resistance phenotype showing cross-resistance to doxorubicin and paclitaxel, overexpression of MDR1, MRP1 and MRP2 proteins, and showing changes in the cytogenetic profile after the end of resistance induction. Cisplatin, when treated alone, presented  $IC_{50}$  of 171.30  $\mu$ M and 10.62  $\mu$ M in lines A549DDP20 and A549 respectively. Furthermore, it was observed that EB-PA showed a medium resistance modulation effect after 3 and 24 hours of treatment, but EB-PB showed a low modulation effect. Thus, the combination obtained with EB-PA's CompuSym software of EB-PA and cisplatin, combination index values  $<1$  were observed, showing a synergistic effect. There is the possibility that this potentiation of cisplatin is due, in principle, to the blockade of efflux pumps related to MDR by EB-PA. 7 different combinations were tested (DDP 10  $\mu$ M+ See 10  $\mu$ M, DDP 10  $\mu$ M+ See 20  $\mu$ M, DDP 20  $\mu$ M+ See 20  $\mu$ M, DDP 10  $\mu$ M+ EB-PA 5  $\mu$ M, DDP 10  $\mu$ M+ EB-PA 10  $\mu$ M, DDP 10  $\mu$ M+ EB- PA 37  $\mu$ M and DDP 20  $\mu$ M+ EB-PA 37  $\mu$ M) observing a reduction in viability, cell density, a decrease in colony formation and an increase in the pro-apoptotic protein BAX in the presence of EB-PA and cisplatin. Furthermore, it was observed that EB-PA does not affect the expression of MDR1, MRP1 and MRP2 proteins alone or in combination. Results from in silico tests showed the interaction at ATP binding sites in the MDR1 protein and in the MRP1 protein hydrophobic interactions and hydrogen bonds of EB-PA and EB-PB.

**Keywords:** *Erythroxylum Bezerreae*, Multiresistance; Tropane alkaloid, lung cancer

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenvolvimento da carcinogénese .....	19
Figura 2 -Estimativa da distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2023, por sexo, exceto pele não melanoma. ....	21
Figura 3- Propriedades fundamentais do câncer. ....	22
Figura 4- Opções de tratamento para o câncer de pulmão são cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia direcionada. ....	24
Figura 5- Mecanismo de ação de cisplatina (DDP) em células de câncer .....	25
Figura 6-Transportadores ABC .....	30
Figura 7- Mecanismo de efluxo de substrato para fora da célula cancerígena pelos transportadores ABC.....	31
Figura 8- Possíveis mecanismos de quimiossensibilizadores naturais de transportadores ABC na resistência a múltiplas drogas no câncer .....	33
Figura 9- As estruturas químicas dos inibidores representativos dos transportadores ABC ..	34
Figura 10-Indução de linhagens celulares resistentes a medicamentos (MDR).....	37
Figura 11-Esquema de indução das células de câncer de pulmão resistentes a cisplatina (A549DDP20) .....	42
Figura 12-Viabilidade celular e de $CI_{50}$ nas linhagens A549 e A549DDP20 após o tratamento de 72 h.....	51
Figura 13-Morfologia da linhagem celular A549 e A549DDP20.....	53
Figura 14-Curvas de crescimento das células e o tempo de duplicação da população de células A549 e células A549DDP20. ....	54
Figura 15-Expressão dos transportadores ABC nas linhagens A549 e A549DDP20.....	55
Figura 16 – Principais alterações estruturais das células parentais A549 .....	56
Figura 17-Principais alterações estruturais das células parentais A549DDP20.....	57
Figura 18- Estruturas químicas a partir do esqueleto tropano com diferentes atividades biológicas .....	64
Figura 19- Estruturas dos alcalóides tropanos (1–8) isolados de <i>Erythroxylum bezerrae</i> .....	65
Figura 20-Desenho experimental .....	68
Figura 21-Estrutura química dos alcaloides tropanos da espécie <i>Erythroxylum Bezerreae</i> . ...	80
Figura 22-Avaliação de hemólises por metodologia <i>in vitro</i> nos alcaloides tropanos EB-PA e EB-PB .....	83
Figura 23-Alcaloides tropanos EB-PA e EB-PB .....	84
Figura 24-Predição de classe alvo dos AKts EB-PA e EB-PB .....	84

Figura 25-Acumulação de Rodamina 123 (Rho-123) nas células A549 e A549DDDP avaliado nos tempos de 1:30, 3:00, 6:00, 12:00 e 24:00 horas de pre-incubação.....	95
Figura 26-Porcentagem de acumulação de Rodamina 123 (Rho123) nas células A549DDDP avaliado nos tempos de 1:30, 3:00, 6:00, 12:00 e 24:00 horas de pre-incubação. ....	97
Figura 27-representações gráficas obtidas do Relatório CompuSyn para combinações de DDP e EB-PA .....	99
Figura 28-Avaliação da viabilidade celular na linhagem A549 e A549DDP20 de 24 horas de pre- incubação e 48 horas pôs incubação com cisplatina <i>in vitro</i> .....	103
Figura 29-Avaliação da densidade celular nas linhagens A549 e A549DDP20 respetivamente por citometria de fluxo com iodeto de propídio.....	105
Figura 30-avaliação da sobrevivência das células tumorais parentais (A549) e resistentes (A549DDP20) <i>in vitro</i> através do ensaio clonogênico.....	106
Figura 31-Expressão da proteína BAX nas linhagens A549 e A549DDP20 foram medidos por western blot após 72 horas de tratamento. ....	108
Figura 32-Combinação de cisplatina e EB-PA não altera significativamente a expressão da proteína MDR1 nas células A549 e A549DDP20 após 72 horas por western blot.....	109
Figura 33- Combinação de cisplatina e EB-PA não altera significativamente a expressão da proteína MRP1 nas células A549 e A549DDP20 após 72 horas por western blot .....	110
Figura 34- Combinação de cisplatina e verapamil altera significativamente a expressão da proteína MRP2 nas células A549 e A549DDP20 após 72 horas por western blot .....	111
Figura 35-Complexo de interação entre EB-PA (A), EB-PB (B) e controle Verapamil (C) contra MRP1 humana.....	113
Figura 36-Complexo de interação entre EB-PA (A), EB-PB (B) e controle Verapamil (C) contra Pgp-1 (MDR1) humana.....	114

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-Gráficos de MFI normalizados ao Verapamil nas linhagens A549 e A549DDP20 após 3 e 24 horas de incubação. ....	90
Gráfico 2-Gráficos de densidade celular nas linhagens A549 e A549DDP20 após 3h e 24h de incubação.....	92
Gráfico 3-Gráfico de iLogP dos alcaloides tropanos e verapamil frente aos dados normalizados MFI no tempo de 24 h na linhagem A549DDP20 .....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-linhagens celulares utilizadas para ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	40
Tabela 2- Quimioterápicos e controles positivos utilizados.....	40
Tabela 3- Valores de CI <sub>50</sub> de Cisplatina em linhagens de células de câncer de pulmão parental e resistente à cisplatina.....	49
Tabela 4-Valores de CI <sub>50</sub> de quimioterápicos em linhagens de células de câncer de pulmão parental e resistentes à Cisplatina após 72 horas de tratamento.....	50
Tabela 5-Curva de concentrações utilizadas de EB-PA, DDP e em combinação após 24 horas de pré-tratamento e 48 horas com DDP. ....	72
Tabela 6-Moléculas analisadas no servidor SwissTarget com sua fórmula molecular e SMILES .....	77
Tabela 7-Avaliação citotóxica dos alcaloides tropanos (AKTs) após 72 horas de incubação. ....	81
Tabela 8-Tabela de índice de seletividade dos alcaloides tropanos após 72 horas de incubação. ....	82
Tabela 9-Porcentagem de hemólise dos compostos EB-PA e EB-PB determinada em eritrócitos de camundongos <i>Mus musculus</i> .....	82
Tabela 10-Predição alvos terapêuticos do AKTs EB-PA.....	85
Tabela 11-Predição alvos terapêuticos do AKTs EB-PB.....	85
Tabela 12-Valores de IC <sub>50</sub> (µM) dos substratos e compostos candidatos como moduladores ou inibidores de resistência <i>in vitro</i> após 24 h de tratamento em linhagens não tumoral, parental e resistentes. ....	86
Tabela 13-Valores de IC <sub>50</sub> (µM) dos substratos e compostos candidatos como moduladores ou inibidores de resistência <i>in vitro</i> após 48h de tratamento em linhagens não tumoral, parental e resistentes. ....	87
Tabela 14-Valores de IC <sub>50</sub> (µM) dos substratos e compostos candidatos como moduladores ou inibidores de resistência <i>in vitro</i> após 72 h de tratamento em linhagens não tumoral, parental e resistentes. ....	87
Tabela 15-Tabela de índice de seletividade das amostras avaliados frente a linhagem não tumoral de fibroblasto de pulmão (MRC-5) após 48 e 72 horas de incubação.....	89
Tabela 16-Tabela de razão da atividade de fluorescência (FAR) na linhagem A549DDP20 nos tempos de 3 e 24 horas de incubação. ....	94
Tabela 17-índice de Combinação de Cisplatinas (DDP) com o verapamil e EB-PA contra o crescimento de células A549 e A549DDP20 <i>in vitro</i> . ....	100



Tabela 18-Avaliação de reversão múltipla após pré-incubação com Verapamil e EB-PA em  
combinação com DDP..... 101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grado Celsius
AKTs	Alcaloides tropanos
A549	Linhagem de carcinoma de pulmão
A549DDP20	Linhagem de carcinoma de pulmão resistente a cisplatina
ABCC1	Gene da proteína 1 de resistência a múltiplas drogas
AlogP	Coefficiente de partição octanol/água
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	enzimas que catalisam a quebra do ATP
BAX	Proteína proapoptótica
BCL2	Proteína antiapoptótica
BCRP	Proteína de resistência ao câncer de mama
BSA	Albumina de soro bovino
ChEMBL	Banco de dados químicos de moléculas bioativas
CI	índice de combinação
CI	intervalo de confiança
cm <sup>2</sup>	centímetro
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
DDP	Cisplatina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
ED <sub>50</sub>	Dose efetiva média
Fa	Fração de afetada
FAR	Razão da atividade de fluorescência
FAU	Unidade arbitrária de fluorescência
FCS	Soro bovino fetal
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenasa
GSH	Glutathiona
h	horas
IC <sub>50</sub>	Metade da concentração inibitória máxima
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IR	índice de resistência
IV	Intravenosa
kDa	Peso Molecular da Proteína
m <sup>2</sup>	metros cuadrados

MDR	Resistência a múltiplas drogas
MDR1	Proteína 1 de resistência a múltiplas drogas
mg	Miligramas
Mins	Minutos
mL	Mililitros
mM	milimolar
MRP1	Proteína 1 de resistência a múltiplas drogas
MRP2	Proteína 2 de resistência a múltiplas drogas
MRPs	Proteínas de resistência a múltiplas drogas
<i>MTT</i>	Brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio
N °S	Número de suplementação com o substrato
NBD	Domínio de ligação de nucleotídeos
nm	Nanometros
NSCLC	Câncer de pulmão de células não pequenas
P53	Genes supressores de tumor
Pgp-1	Glicoproteína P-1
pH	potencial de hidrógeno
PI	Iodeto de propídeo
PVDF	El fluoruro de polivinilideno
R <sup>2</sup>	Coefficiente de Determinação
REDOX	oxidação-redução
Rho-123	Rodamina 123
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RMSD	Root Mean Square Deviation
RNA	ácido ribonucleico
rpm	evolução por minuto
RPMI 1640	Medio Roswell Park Memorial Institute
SEM	Erro padrão da média
SMILES	Sistema simplificado de entrada de linha de entrada molecular
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TBS-T	Solução salina tamponada com Tris com Tween 0,1%
Td	Tempo de duplicação
TMD	Domínio transmembrana
V	Voltagem
v/v	Volume por porcentagem de volume
$\mu\text{g/mL}$	Microgramas por mililitros
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>19</b>
1.1 Câncer.....	19
1.2 As características fundamentais do câncer.....	21
1.3 Câncer de pulmão.....	22
1.4 Tratamento para o câncer de pulmão.....	23
1.5 Quimiorresistência.....	26
1.6 Transportadores ABC.....	28
1.7 Compostos moduladores da resistência a múltiplas drogas (MDR).....	33
<b>2. CAPÍTULO 1</b> .....	<b>36</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	36
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
<b>4. MATERIAS E METODOS</b> .....	<b>40</b>
4.1 Linhagens celulares e condições de cultura.....	40
4.2 Controles positivos utilizados.....	40
4.3 Desenvolvimento de linhagem resistente e condições de cultura.....	41
4.4 Avaliação da morfologia celular.....	44
4.5 Curvas de crescimento e o tempo de duplicação (Td).....	44
4.6 Avaliação da expressão proteica por Western Blot.....	45
4.7 Ensaio citogenético.....	47
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
5.1 Ensaio de citotoxicidade alamar blue.....	49
Indução e monitoramento da linhagem celular resistentes a Cisplatina A549DDP20. ....	49

5.2 Características morfológicas das células A549 e A549DDP20 .....	52
5.3 Curvas de crescimento e tempo de duplicação (Td).....	53
5.4 Determinação da expressão dos transportadores ABC nas linhagens A549 e A549DDP20 por western blot .....	54
5.6 Ensaio citogenético.....	55
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÃO.....	63
8. CAPÍTULO 2 .....	63
8.1 INTRODUÇÃO.....	63
9.OBJETIVOS.....	67
9.1 Objetivo general .....	67
9.2 Objetivos específicos.....	67
10. MATÉRIAS E MÉTODOS .....	67
10.1 Obtenção dos Alcaloides tropanos (AKTs).....	68
10.2 Avaliação da atividade citotóxica pelo ensaio Alamar blue <i>in vitro</i> .....	69
10.3 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos em camundongos Swiss <i>Mus musculus</i> .....	70
10.4 Citotoxicidade e sinergismo da combinação de cisplatina e EB-PA.....	71
10.5 Avaliação da densidade e viabilidade celular por citometria de fluxo .....	72
10.6 Ensaio de efluxo Rodamina 123 por citometria de fluxo.....	73
10.7 Ensaio da percentagem de acumulação de Rodamina 123 por espectrofluorometria .....	74
10.8 Análise de teste de sobrevivência através do ensaio clonogênico.....	75
10.9 Avaliação do racionamento dirigido por bioensaio <i>in silico</i> .....	77
10.10 Simulação de docking molecular .....	77
10.11 Avaliação da expressão da proteína BAX, MDR1, MRP1 e MRP2 por western blot. ....	78
11. RESULTADOS.....	80
11.1 Avaliação da atividade citotóxica dos alcaloides tropanos (AKTs) .....	80
11.2 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos de camundongos Swiss <i>Mus musculus</i> .....	82

11.3 Avaliação teórica de alvos farmacológicos .....	83
10.4 Avaliação da citotoxicidade celular de EB-PA e EB-PB.....	86
11.5 Ensaio de extrusão de rodamina 123 (Rho-123) .....	90
11.6 Avaliação da densidade celular por citometria de fluxo.....	91
11.7 Percentagem de acumulação de Rodamina 123 (Rho-123) nas células A549 e A549DDP20.....	95
11.8 Avaliação do efeito sinérgico de EB-PA em combinação com cisplatina na linhagem A549 e A549DDP20 <i>in vitro</i> .....	98
11.9 Avaliação da viabilidade e densidade celular nas linhagens A549 e A549DDP20 em combinações com cisplatina, verapamil e a EB-PA após 24 horas de pré-tratamento e pós tratamento da cisplatina (48 h) .....	101
11.10 Avaliação da sobrevivência através do ensaio clonogênico .....	105
11.11 Avaliação do processo de morte celular após o tratamento com EB-PA e cisplatina nas linhagens A549 e A549DDP20 por western blot.....	107
11.12 Avaliação da modelagem por docking molecular das proteínas MDR1 e MRP1 em complexo com verapamil, EB-PA e EB-PB.....	113
<b>12. DISCUSSÃO</b> .....	<b>116</b>
<b>13. CONCLUSÃO</b> .....	<b>127</b>
<b>14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	<b>128</b>
<b>ANEXO A</b> .....	<b>147</b>
<b>ANEXO B</b> .....	<b>148</b>

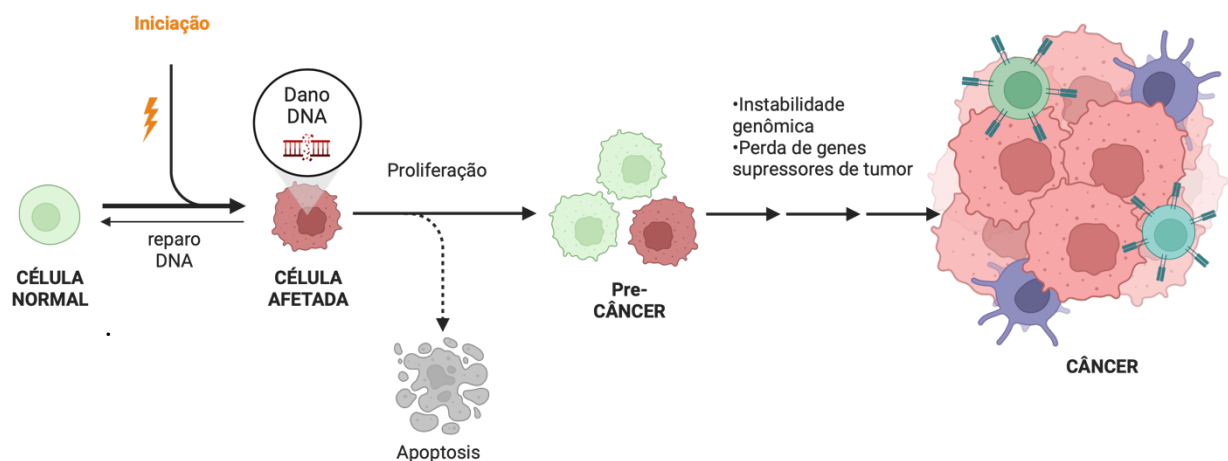
## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Câncer

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, figurando como uma das principais causas de morte e como consequência, uma das principais barreiras para o aumento da expectativa de vida do paciente. O câncer é uma doença caracterizada na qual algumas células do corpo crescem de forma incontrolada (WHO, 2020), também é definida pelas alterações dinâmicas no genoma dessas células, o que leva à formação do tumor (NCI, 2021). Na carcinogênese, fatores indutores de câncer ou fatores carcinogênicos acontecem durante a transformação de células tumorais, com a menção de que o termo carcinogênese define a iniciação de um tumor, e oncogênese sua manutenção e posterior evolução (Baba et al; Bucharest et al, 2007).

A carcinogênese é a transformação de uma célula saudável em uma célula cancerosa. Este processo começa com uma única célula na qual os genes certos sofrem mutação, de modo que a célula não morre adequadamente e começa a proliferar de forma anormal (pré-câncer). Então, ocorrem mutações adicionais que selecionam células de crescimento mais rápido dentro desta população, levando a um tumor com crescimento rápido e malignidade. No momento em que as células se tornam cancerosas, os proto-oncogenes são ativados e os genes supressores de tumor inativados (Figura 1).

Figura 1- Desenvolvimento da carcinogênese



Fonte: própria do autor (Biorender.com)

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2019, o câncer é a segunda causa de morte em 112 dos 183 países e ocupa o terceiro ou quarto lugar em outros 23 países no mundo (Sung et al., 2021). Em 2024, projeta-se que 2.001.140 novos casos de câncer. A mortalidade por câncer continuou a diminuir até 2021, evitando mais de 4 milhões de mortes desde 1991 devido às reduções no tabagismo, detecção precoce de alguns tipos de câncer e melhores opções de tratamento em cenários adjuvantes e metastáticos. No entanto, esses ganhos são ameaçados pelo aumento da incidência de 6 dos 10 principais tipos de câncer. As taxas de incidência aumentaram durante 2015–2019 em 0,6%–1% anualmente para cânceres de mama, pâncreas e corpo uterino e em 2%–3% anualmente para cânceres de próstata, fígado (feminino), rim e papilomavírus humano associados ao câncer oral (Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024).

Para o Brasil, foram estimados para o ano de 2023-2025, 704 mil casos novos de câncer. Excluindo o câncer de pele não melanoma, espera-se a ocorrência de 483 mil casos novos, sendo 49,5% em homens (239 mil casos novos) e 50,5% (244 mil casos novos) em mulheres. O câncer infantojuvenil (de 0 a 19 anos) representará 7.900 casos, com discreto predomínio no sexo masculino com 4.200 (53,2%) casos novos e 3.700 (46,8%) no sexo feminino. Os dez principais tipos de câncer representam mais de 60% do total de casos novos. O câncer de pulmão, segundo as estimativas 2023, é o terceiro mais comum em homens (18.020 casos novos) e o quarto em mulheres no Brasil (Figura 2) sem contar o câncer de pele não melanoma. É o primeiro em todo o mundo em incidência entre os homens e o terceiro entre as mulheres. Em mortalidade é o primeiro entre os homens e o segundo entre as mulheres segundo estimativas mundiais de 2020, que apontou incidência de 2,2 milhões de casos novos, sendo 1,4 milhão em homens e 770 mil em mulheres (INCA, [s.d.]). Além disso, o câncer de mama feminina é o mais incidente no mundo, com 2,3 milhões (11,7%) de casos novos, seguido pelo câncer de pulmão, com 2,2 milhões (11,4%); colón e reto, com 1,9 milhão (10,0%); próstata, com 1,4 milhão (7,3%); e pele não melanoma, com 1,2 milhão (6,2%) de casos novos. Na figura 2, se observa as estimativas do câncer no Brasil por sexo, mostrando que o câncer de pulmão é o mais frequente em homens, com 1,4 milhão (14,3%) dos casos novos, seguido do câncer de próstata, com 1,4 milhão (14,1%); colón e reto com 1 milhão (10,6%); pele não melanoma com 722 mil (7,2%) e estômago com 719 mil (7,1%) casos novos no mundo. Nas mulheres, o câncer de mama é o mais incidente, com 2,3 milhões (24,5%) de casos novos, seguido pelos cânceres de colón e reto, com 865 mil (9,4%); pulmão, com 771 mil (8,4%); colo do útero, com 604 mil (6,5%); e pele não melanoma, com 475 mil (5,2%) casos novos no mundo (De et al., 2023)



Figura 2 -Estimativa da distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2023, por sexo, exceto pele não melanoma.

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

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2023

O número estimado de casos novos de câncer de traqueia, brônquios e pulmão para o Brasil, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, é de 32.560 casos, correspondendo ao risco estimado de 15,06 casos por 100 mil habitantes, sendo 18.020 casos entre os homens e 14.540 casos entre as mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 17,06 casos novos a cada 100 mil homens e de 13,15 a cada 100 mil mulheres (INCA,2023).

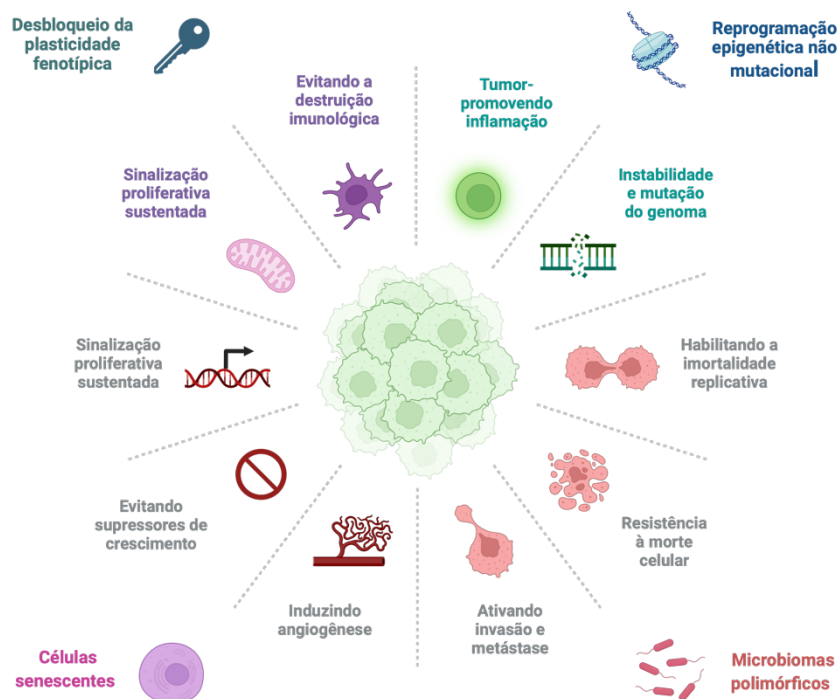
## 1.2 As características fundamentais do câncer

As características do câncer (*Hallmarks of cancer*) foram propostas como um conjunto de capacidades funcionais adquiridas pelas células humanas à medida que passam da normalidade para estados de crescimento neoplásico, mais especificamente capacidades que são cruciais para a sua capacidade de formar tumores malignos (Hanahan, 2022). Dessa forma a amplitude do escopo de estudo dessas características é abrangente.

*Hallmarks of cancer* foram propostas pela primeira vez em 2000 por Hanahan D. e Weinberg R. A., e atualizadas por Hanahan D. no ano 2022. *Hallmarks of cancer* é uma ferramenta heurística para a compreensão da vasta complexidade dos fenótipos e genótipos do câncer em um conjunto provisório de princípios subjacentes. À medida que o conhecimento dos mecanismos do câncer progrediu, outras facetas da doença surgiram como potenciais refinamentos. Devido que, como observamos na época, essas características marcantes iniciais, por si só, não conseguem abordar a complexidade da patogênese do câncer, ou seja, os

mecanismos moleculares e celulares precisos que permitem que as células pré-neoplásicas em evolução desenvolvam e adquiram essas capacidades fenotípicas aberrantes no decorrer do processo, desenvolvimento tumoral e progressão maligna (Hanahan, 2022). As últimas atualizações do 2022, foram descritas as plasticidades fenotípicas, reprogramação epigenética, os microbiomas polimórficos e células senescentes podem ser adicionadas à lista de tipos de características funcionalmente importantes no microambiente tumoral (Figura 3).

Figura 3- Propriedades fundamentais do câncer.



Fonte: Adaptado de Hanahan, 2022 (Biorender.com)

### 1.3 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer entre os homens e a segunda principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo. Apesar dos avanços

importantes do conhecimento da biologia das células cancerígenas e das terapias anticancerígenas, como a quimioterapia, a radioterapia e as terapias direcionadas, as taxas de sobrevivência aos cinco anos permanecem baixas (<60%) (American cancer society, [2024]. Os principais fatores de risco para o câncer de pulmão são o uso de cigarros, ser fumante passivo, dieta desregulada (com excesso de enlatados, embutidos, frituras e pimenta), ingestão de álcool, a falta de exercícios ou atividades físicas rotineiras, poluição do ar, exposição ocupacional e suscetibilidade genica. Vale ressaltar que o surgimento ou não do câncer de pulmão – assim como de outros tipos de cânceres - varia de indivíduo para indivíduo, podendo ser uma combinação de vários desses fatores (Malhotra et al., 2016).

Os tumores pulmonares são amplamente classificados em câncer de pulmão de pequenas células (CPPC, do inglês small cell lung cancer - SCLC) e câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC, do inglês: non-small cell lung cancer- NSCLC). Os CPCPs são tumores malignos que compreendem aproximadamente 15% dos cânceres pulmonares e podem ser identificados por suas características neuroendócrinas. Já os CPCNP representam 80-85% de todos os cânceres de pulmão e incluem outros tipos de tumores que não sejam CPCPs. Tais distinções refletem a histopatologia da doença, bem como o decurso dela, e se relacionam as opções terapêuticas encontradas para tratar um tipo ou outro (Basumallik; Agarwal, 2023; López et al., 2023).

Geneticamente, mais do 60% dos casos de CPNPC caracterizam-se pela hiperexpressão do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico com atividade tirosina quinase (epidermal growth fator receptor, EGFR), gene este localizado no braço curto do cromossomo 7 (7p11.2). Ademais, observou-se que, apesar de a maioria responder bem no início do tratamento, uma grande porcentagem tem adquirido resistência à terapia dentro de um ano e ocorre em 50% dos casos. Curiosamente, os tumores CPPC tendem a recorrer como variantes quimiorresistentes e ocasionalmente mostram progressão para um fenótipo NSCLC (Abeloff et al., 1979; Zullo et al., 2023).

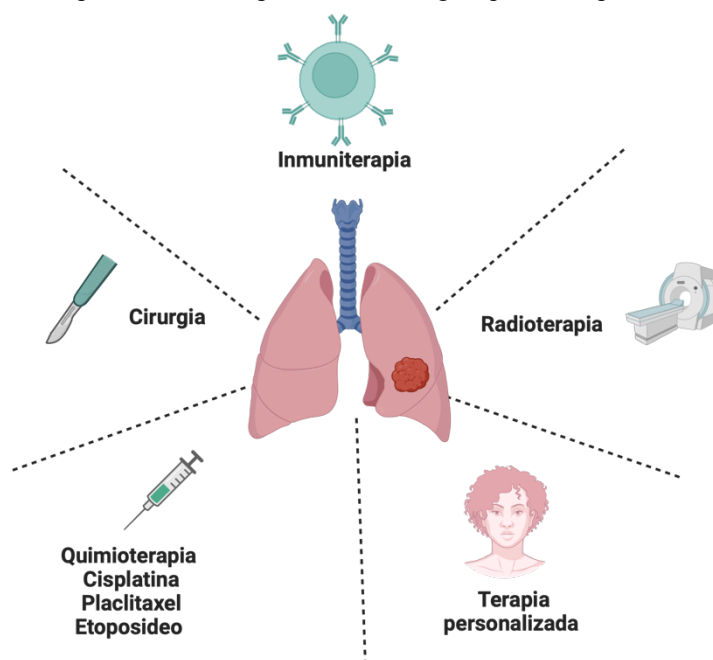
#### **1.4 Tratamento para o câncer de pulmão**

O tratamento ao longo da história tem variado desde a remoção de órgãos até o direcionamento de marcadores específicos nas células cancerígenas com medicamentos

moleculares. Hoje em dia, o tratamento do câncer de pulmão é ainda mais diversificado, abrangendo desde terapias gerais, por exemplo irradiação, cirurgia e quimioterapia padrão até terapias mais sofisticadas, por ex. terapia imunobiológica (Figura 4). Outras terapias personalizadas estão em desenvolvimento (Seclì et al., 2023).

Dentre os tratamentos, a quimioterapia é um pilar de longa data no tratamento do câncer de pulmão, uma vez que a maioria dos diagnósticos ocorrem em estágios avançados da doença. Os principais objetivos da quimioterapia no estágio avançado ou metastático do câncer de pulmão são a melhoria da sobrevida e a atenuação dos sintomas. A quimioterapia à base de platina continua sendo a espinha dorsal do tratamento na maioria dos casos, sendo que a cisplatina foi associada a uma melhora modesta na sobrevida (Misono et al., 2021).

Figura 4- Opções de tratamento para o câncer de pulmão são cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia direcionada.

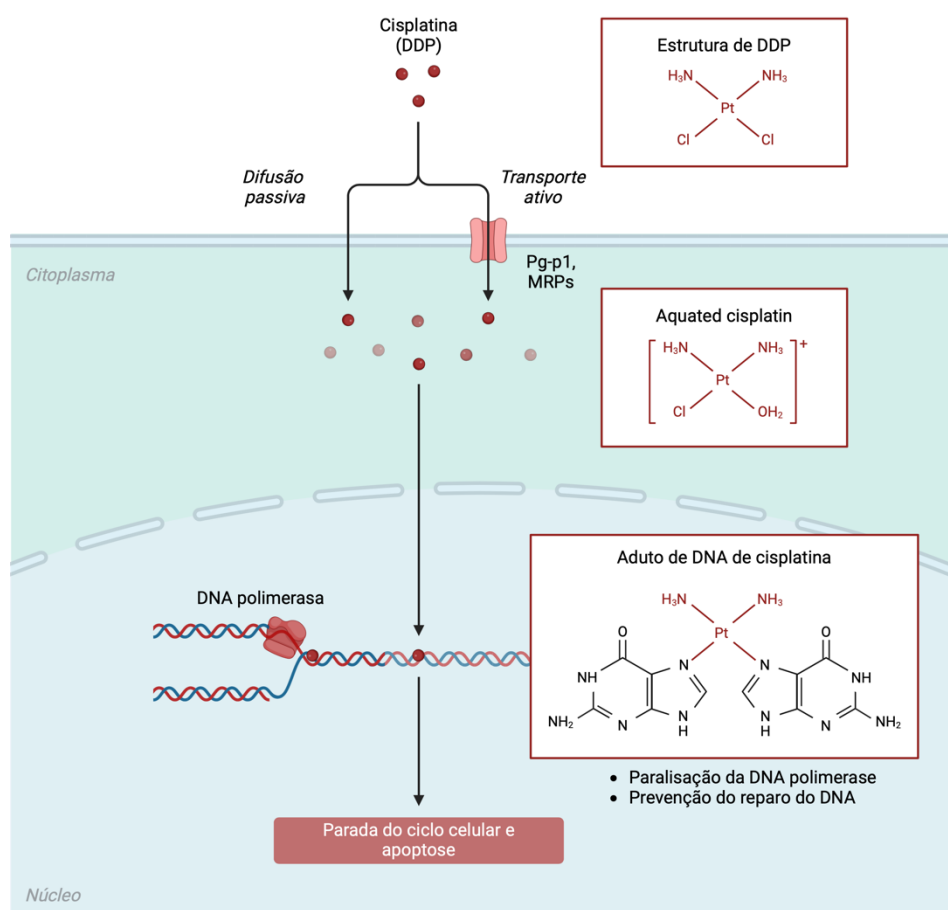


Fonte: adaptada de Ashrafi et al. 2022 (Biorender.com)

Existem quatro grandes categorias de medicamentos quimioterapêuticos mais utilizados no câncer de pulmão: (1) agentes alquilantes; (2) medicamentos direcionados aos microtúbulos (paclitaxel, docetaxel e vinorelbina); (3) antimetabólitos (pemetrexedo e gencitabina); e (4) inibidores da topoisomerase (etoposídeo) (Jordan; Wilson, 2004; Olaussen; Postel-vinay, 2016). Nesse contexto, a cisplatina (DDP) é um composto de platina de molécula pequena que foi acidentalmente descoberto por inibir o crescimento de *Escherichia coli* e mais tarde também

matou células tumorais (Rosenberg, 1973). Os compostos de platina, incluindo cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, ainda são terapias clínicas de primeira linha e constituem parte do regime de tratamento para pacientes com muitos tipos de câncer, incluindo cabeça e pescoço, testicular, ovariano, cervical, pulmonar, colorretal e linfoma recidivante. Dentro do seu mecanismo de ação as lesões citotóxicas entrando dentro da célula por mecanismos de difusão passiva e transporte ativo conhecidas como adutos de platina-DNA, que formam principalmente ligações cruzadas intracadeias que ativam a via apoptótica, resultando em morte celular por exemplo a DDP (Figura 5) (Siddik, 2003a).

Figura 5- Mecanismo de ação de cisplatina (DDP) em células de câncer



Fonte: Própria do autor (Biorender.com)

No entanto, o crescente interesse em agentes terapêuticos não citotóxicos, a quimioterapia continua a ser a opção de tratamento padrão para pacientes com câncer de pulmão avançado. Apesar da resposta inicial aos quimioterápicos os pacientes com câncer de pulmão desenvolvem rapidamente quimiorresistência, levando à progressão da doença (Jordan; Wilson,

2004; Olaussen; Postel-vinay, 2016). Portanto, compreender os mecanismos moleculares da resistência terapêutica é importante no desenvolvimento de novas estratégias para melhorar a taxa de sobrevivência global de pacientes com câncer de pulmão devido a heterogeneidade e trans diferenciação Inter e intratumoral generalizada proporcionam múltiplos mecanismos pelos quais a resistência ao tratamento pode se desenvolver e, assim, representar ameaças ao tratamento do câncer de pulmão (Ashrafi et al., 2022).

### **1.5 Quimiorresistência**

No ano 1966, foi descrito que a quimioterapia quando utilizado um único agente antineoplásico, apresentava 20% mais chance de desenvolver resistência, quando comparado com diferentes agentes quimioterápicos em conjunto. Os mecanismos de resistência ainda não eram totalmente descobertos, porém se suspeitava que o mecanismo responsável era a expressão de resistência a múltiplas drogas (siglas em inglês: MDR), já que era identificada em diferentes tecidos tumorais depois de serem tratadas com diferentes agentes quimioterápicos como a vincristina e a doxorrubicina, entre outros. No entanto, na época também foi observado que quando era utilizado bloqueadores do cálcio, a concentração intracelular do quimioterápico aumentava. Então, para esse tempo ainda era um mecanismo confuso no qual só se conhecia como efluxo de drogas (Jaap verweij, Kees nooter, 1966). Em 1973, Dano foi o primeiro a observar em dois tipos de células multirresistentes na qual daunomicina era efluxada. Depois de mais de 40 anos de estudo, já se sabe que essa resistência é especialmente atribuída aos transportadores MDR1 ou ABCC1 (Wiese; Stefan, 2019).

Desde então, o conceito de quimiorresistência passou a estar associado também a outras doenças, incluindo o câncer, já que mecanismos similares foram observados nas células de pacientes que recebiam algum tipo de quimioterapia. Na última década, vários mecanismos potenciais foram identificados por vários estudos como contribuintes para a MDR, que podem ser categorizados de acordo com as suas características. A resistência aos medicamentos pode ocorrer devido à ativação de mecanismos intrínsecos (pré-existent) ou adquiridos (induzidos por medicamentos), e ambos os tipos de fatores desempenham papéis significativos no desenvolvimento da resistência aos medicamentos como uma variedade de estratégias para limitar ou contornar o processo de morte celular.

Alguns mecanismos que promovem ou possibilitam a resistência a fármacos, como inativação de fármacos, alteração de alvo de fármacos, efluxo de fármacos, reparo de danos no DNA, inibição de morte celular e transição epitelial-mesenquimal, bem como a heterogeneidade inerente das células tumorais desempenha um papel na resistência às fármacos, (Hanahan; Weinberg, 2011; Housman et al., 2014) é de suma importância na avaliação da resposta à quimioterapia; portanto, sua relevância é inequívoca na prática clínica.

A MDR desempenha um papel importante para o efeito reduzido da quimioterapia em muitos tipos de câncer. Experimentalmente, as células tumorais *in vitro* expostas a um agente citotóxico desenvolvem resistência cruzada a uma gama de compostos estrutural e funcionalmente não relacionados (Loria et al., 2022). Foi demonstrado que as células cancerígenas podem desenvolver resistência à cisplatina através de: alterações no transporte do fármaco levando à redução da acumulação intracelular de cisplatina devido aos transportadores ativos, um sistema melhorado de desintoxicação de medicamentos devido a níveis elevados de eliminadores intracelulares, tais como glutatona e/ou metalotioneínas, alterações na reparação do DNA envolvendo aumento da reparação por excisão de nucleotídeos, reparo de reticulação entre cadeias ou reparo de perda de incompatibilidade, alterações nos mecanismos de tolerância a danos no DNA, e alterações nas vias de morte celular por apoptose (Han et al., 2014).

É muito comum que as células cancerígenas sejam resistentes aos agentes quimioterápicos devido a um mecanismo multifatorial. No entanto, a superexpressão dos transportadores ABC dependentes de ATP (MDR1, MRP1 e BCRP) está entre as mais razões importantes (Ke et al., 2013a; Li et al., 2009; Lu; Pokharel; Bebawy, 2015).

No câncer de pulmão, descobriu-se que amostras de tumor superexpressam MDR1 e essa superexpressão demonstrou, em alguns casos, estar correlacionada com uma sobrevivência global baixa (Loria et al., 2022; Savaraj et al., 1997). Além disso, no caso de linhagens celulares o conceito deve ser alargado aos mecanismos de farmacoresistência ou MRPs para incluir a falta de resposta a novas abordagens farmacológicas, tais como medicamentos direcionados e imunoterapêuticos. Esses MRPs são o resultado de uma rede complexa que envolve a expressão dinâmica de um grupo de algumas centenas de genes, responsáveis pelo chamado resistoma, capazes de sinergizar entre si para reduzir a sensibilidade das células cancerígenas à farmacoterapia. Incluem quantidades intracelulares diminuídas de fármacos ativos, reduzindo

a sua captação ou aumentando o seu efluxo (MPR1); comprometimento dos processos de ativação/inativação metabólica (MPR2) (Cheng et al., 2018; Li et al., 2016, 2020; Marin; Macias, 2021; Ren et al., 2015)

No aspecto genético do câncer de pulmão, uma vez que a resistência do câncer aos medicamentos também pode ser devida a alterações na expressão gênica, pois alterações em certos genes reguladores podem levar ao aumento ou diminuição dos níveis de expressão de proteínas importantes na resistência e sobrevivência das células cancerígenas. Podem-se mencionar, o efeito direto é a função fisiológica alterada dos transportadores de membrana, ou seja, maior efluxo (MDR1 e MRPs) e o efeito indireto é devido a alterações estruturais em outras proteínas, por exemplo a BAX e Bcl-2, são proteínas envolvidas na via intrínseca do apoptose, incluindo membros da família Bcl-2 e o supressor de tumor p53, são comumente desreguladas em cânceres com MDR, que controlam a ativação de caspases, são frequentemente superexpressas. Compreender os aspectos bioquímicos e genéticos que contribuem para a MDR no câncer pode melhorar o desenvolvimento de novas opções de tratamento para pacientes com câncer (Funk et al., 2020; Liu et al., 2016; Matsumoto et al., 2016).

## 1.6 Transportadores ABC

A capacidade dos transportadores ABC de efluir diversos medicamentos antes de atingirem os alvos pretendidos forneceu uma explicação para o fenômeno clínico da MDR. (Emran et al., 2022a). No paciente, um dos principais mecanismos de quimiorresistência é a superexpressão de multirresistência (MDRs) e Proteínas de multirresistência (MRPs), adquiridas durante o tratamento, e ainda permanece um grande desafio na oncologia médica (Halder et al., 2022).

Em humanos, existem pelo menos 48 membros da família de proteínas dos transportadores de cassete de ligação ao trifosfato de adenosina (ATP) (ABC), que são uma classe de bombas de efluxo dependentes de energia envolvidas em diversas funções fisiológicas (Dassa, 2003). Entre esses membros, três transportadores foram caracterizados como os principais responsáveis pela resistência a múltiplas drogas: proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP ou ABCG2), proteína 1 associada a MRP (MRP1 ou ABCC1) e glicoproteína P (Pgp-1 em resumo, também chamada de proteína 1 de resistência a múltiplas drogas, MDR1 ou



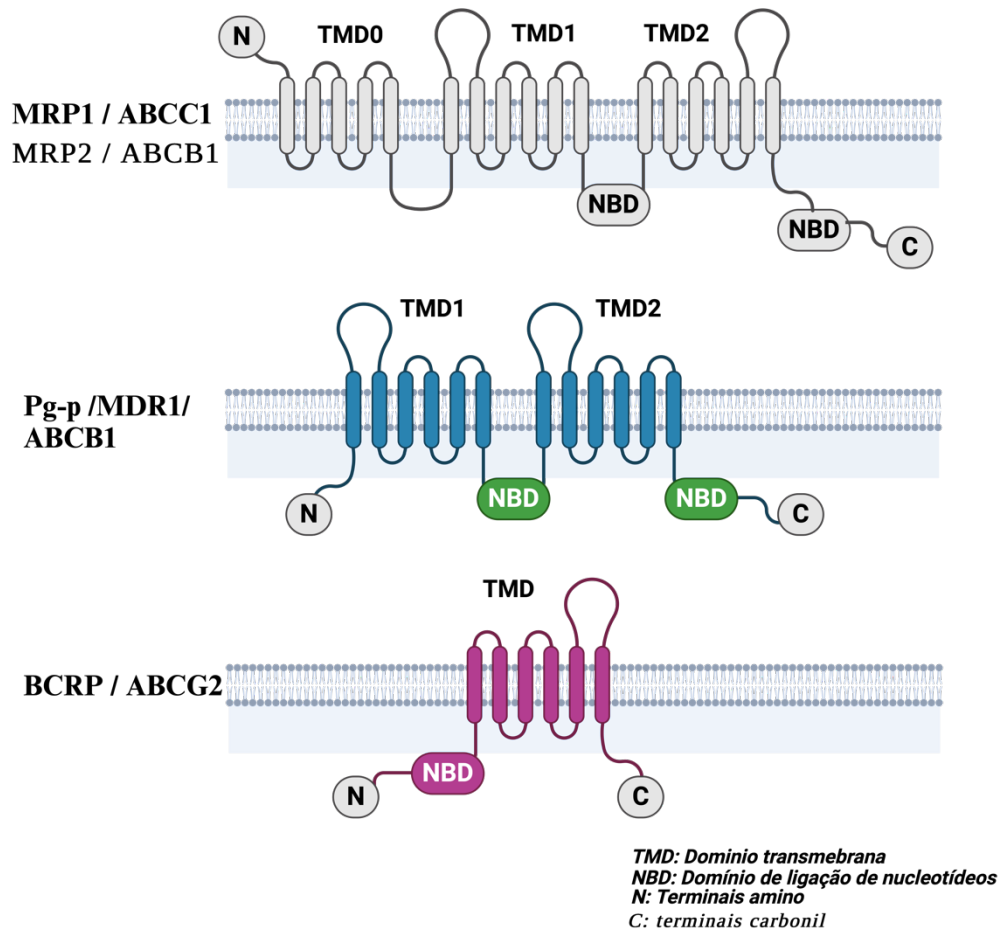
ABCB1) (Gottesman & Ling, 2006; Waghray & Zhang, 2018). Outro transportador ABC, o MRP2, é codificado pelo gene *ABCC2* e demonstrou desempenhar um papel importante também na quimiorresistência, através do comprometimento dos processos metabólicos de ativação/inativação (Figura 6). Neste contexto, a exposição a medicamentos anticancerígenos causa superexpressão de portadores, uma das principais razões para a multirresistência na quimioterapia do câncer (Marin & Macias, 2021; Z. Wang et al., 2017).

Os transportadores ABC são organizados em quatro domínios, a saber, dois domínios ou subunidades de ligação a nucleotídeos (NBD) bem conservados e dois domínios ou subunidades transmembrana (TMD), que podem ser mais heterogêneos. Os transportadores ABC são frequentemente montados a partir de subunidades proteicas separadas compostas por dois NBDs e duas TMDs, idênticas (homodiméricas) ou diferentes (heterodiméricas) (GENOVESE et al., 2017). As TMDs são predominantemente compostas por aminoácidos hidrofóbicos incorporados na bicamada da membrana e definem a via de translocação. No nível da sequência, as TMDs são estruturalmente diversas, o que reflete a diversidade química dos substratos translocados. Os NBDs hidrofílicos estão localizados na superfície citoplasmática da membrana e estão envolvidos na ligação e hidrólise de moléculas de ATP. Em contraste com a TMD, os NBD são caracterizados por motivos de sequência central de regiões altamente conservadas, nomeadamente o A-loop (empilhamento de bases de ligação de ATP), Walker A e Walker B (ligação de ATP e hidrólise) localizado no subdomínio  $\alpha$ -helicoidal, uma característica da superfamília ABC, não presente em outras NTPases P-loop, como a F1-ATPase (Gonçalves; Cardoso; Ferreira, 2020).

Dentre as características estruturais da Pgp-1 codificada pelo gene *MDR1* ou *ABCB1*, e em um único polipeptídeo, ela compreende 1276-1280 aminoácidos com massa molecular de aproximadamente 170 kDa e estrutura duplicada em tandem, com cada metade da molécula contendo seis hélices transmembrana (TMH). De essa forma, duas DTMs formam um canal grande e flexível com 12 TMHs para ligação e efluxo de medicamentos (JONES; GEORGE, 1998). Por outro lado, o MRP1 de 190 kDa, codificado pelo gene *ABCC1*, possui uma estrutura central que consiste em dois domínios transmembrana (TMD), cada um seguido por um domínio de ligação a nucleotídeos (NBD). Em comum com o MRP2 codificado pelo gene *ABCC2*, contém uma terceira DTM (TMD0) com cinco segmentos transmembrana previstos e um terminal NH2 extracitosólico conectado à estrutura central por uma região ligante (L0) (Rosenberg et al., 2001). No entanto, o BCRP é conhecido por um “meio de transporte” de 72

kDa codificado pelo gene *ABCG2*; consiste em seis domínios transmembrana e funciona como um homodímero ou homotetrâmero com um segmento transmembrana C-terminal e um sítio de ligação de ATP N-terminal (Kage et al., 2002)

Figura 6-Transportadores ABC

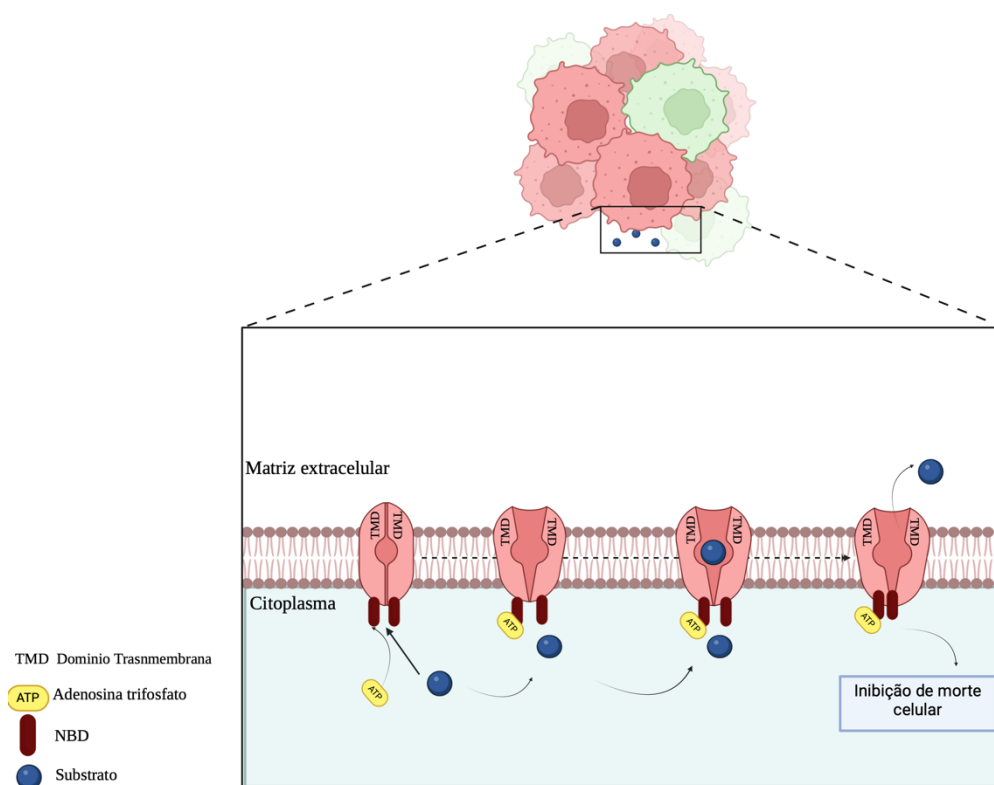


Fonte: Própria do autor (Biorender.com)

Essencialmente, quando estes transportadores de fármacos ABC são superexpressas em células cancerígenas, podem conferir resistência cruzada a múltiplos fármacos de diferentes classes químicas através da extrusão ativa de fármacos citotóxicos, reduzindo assim a quantidade acumulada de fármaco abaixo do nível quimioterapêuticos eficaz e resultando em MDR (Loria et al., 2022). Os substratos do MDR1 e MRPs são principalmente compostos hidrofóbicos e anfipáticos que são transportados ativamente para fora das células por um mecanismo dependente de ATP (Jaramillo et al., 2018).

Os transportadores MDR1 e MRPs reconhecem substratos semelhantes no câncer de pulmão como a cisplatina, carboplatina, docetaxel, carfilzomibe (Kanintronkul et al., 2011; Li et al., 2009; Liu et al., 2017; Savaraj et al., 1997). Além disso, alguns como os taxanos (Paclitaxel e Docetaxel) são substratos preferíveis para MDR1. Apesar da baixa homologia estrutural e de sequência entre MDR1 e MRPs, ainda assim eles mostram especificidade de substrato sobreposta, como ligação a uma ampla gama de substratos e utilização de hidrólise de ATP para efluir os medicamentos quimioterápicos para fora das células cancerígenas (Figura 7) (Haque et al., 2022; Banerjee mustafi et al., 2016; Borst et al., 2000; Zhang et al., 2015)

Figura 7- Mecanismo de efluxo de substrato para fora da célula cancerígena pelos transportadores ABC



Fonte: própria do autor (Biorender.com)

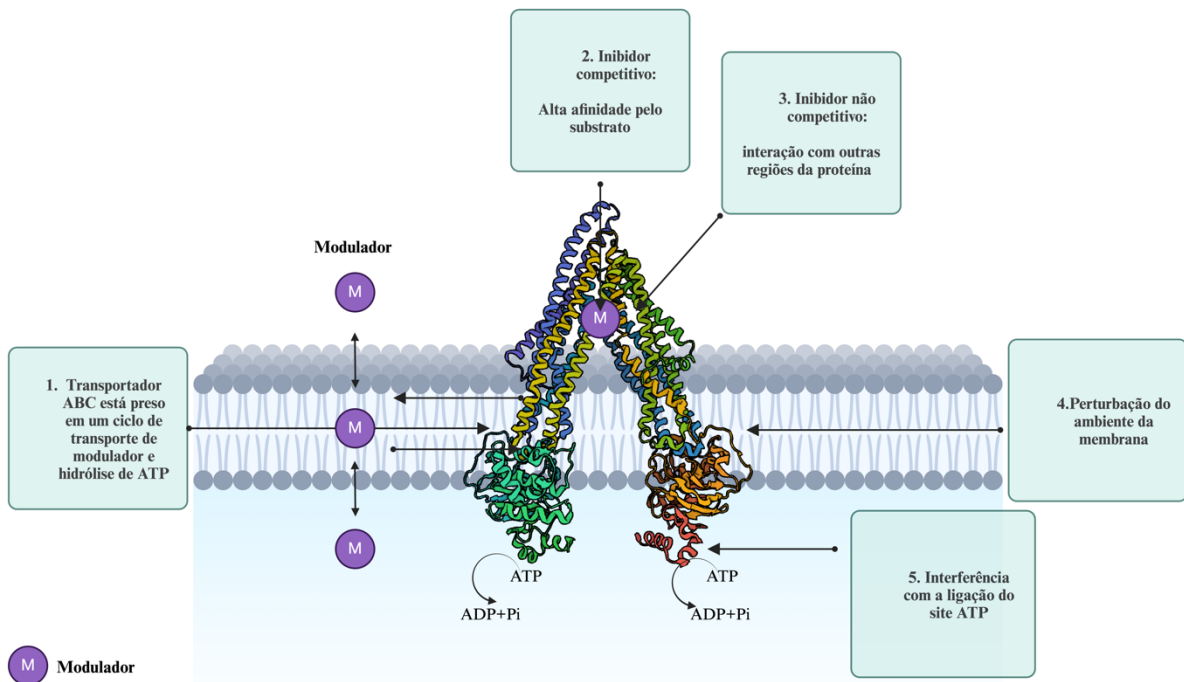
Nesse contexto, a superexpressão do transportador da família ABC (MDR1, MPR1 e MRP2) faz com que a cisplatina seja bombeada da célula para o espaço extracelular, reduzindo a concentração intracelular de cisplatina por mostrar afinidade aos transportadores (Banerjee mustafi et al., 2016; Borst et al., 2000; Zhang et al., 2015).

Com base nas interações entre transportadores ABC e vários ligantes (modulares), os ligantes podem ser classificados como inibidores, substratos, ativadores e indutores. Os inibidores são descritos como compostos ou moléculas que se ligam direta ou indiretamente ao transportador para prejudicar a sua atividade de transporte. Substratos são compostos que são expelidos pelo transportador. Ativadores são compostos que atuam para aumentar a atividade de transporte desses transportadores, facilitando mudanças conformacionais que promovem o transporte ou efluxo de um substrato. Os indutores são ligantes que regulam positivamente os níveis de expressão proteica do transportador. Além disso, os moduladores são conhecidos como quimiosensibilizadores porque são usados quando as células tumorais não respondem mais à quimioterapia mostrando uma abordagem principal de contornar o mecanismo de resistência (Gatouillat; Madoulet, 2014).

Ao aplicar a modulação bioquímica, a atividade do transportador pode ser inibida por um modulador sem necessariamente influenciar o equilíbrio normal das células saudáveis, portanto, a necessidade de identificar moduladores é muito essencial no tratamento do câncer. Agentes terapêuticos que inibem a atividade do transportador poderiam ser usados em conjunto com outros medicamentos anticâncer que são substratos conhecidos do transportador. Assim, o inibidor identificado atenuaria a atividade de efluxo do transportador, permitindo que o fármaco anticancerígeno estivesse biodisponível na concentração intracelular apropriada para exercer o seu efeito nas células cancerígenas. Consequentemente, potencializando a terapia medicamentosa combinatória (uso de dois ou mais agentes farmacológicos administrados separadamente ou em dose fixa em formulação única) em pacientes com câncer (Poku; Iram, 2022).

Além disso, existem diferentes mecanismos pelos quais alguns compostos podem interagir com a modulação dos transportadores ABC, como a interação com os NBDs portanto, podem regular a capacidade do MDR1 e MRPs na presença de um moduladores o transportador ABC estar preso em um ciclo de transporte do ATP como modulador, inibor competitivo, inibidor não competitivo, perturbação do ambiente da membrana e interferência ao se ligar e hidrolisar o ATP, modulando assim sua atividade de transporte (Figura 8) (Morris; Zhang, 2006).

Figura 8- Possíveis mecanismos de quimiossensibilizadores naturais de transportadores ABC na resistência a múltiplas drogas no câncer



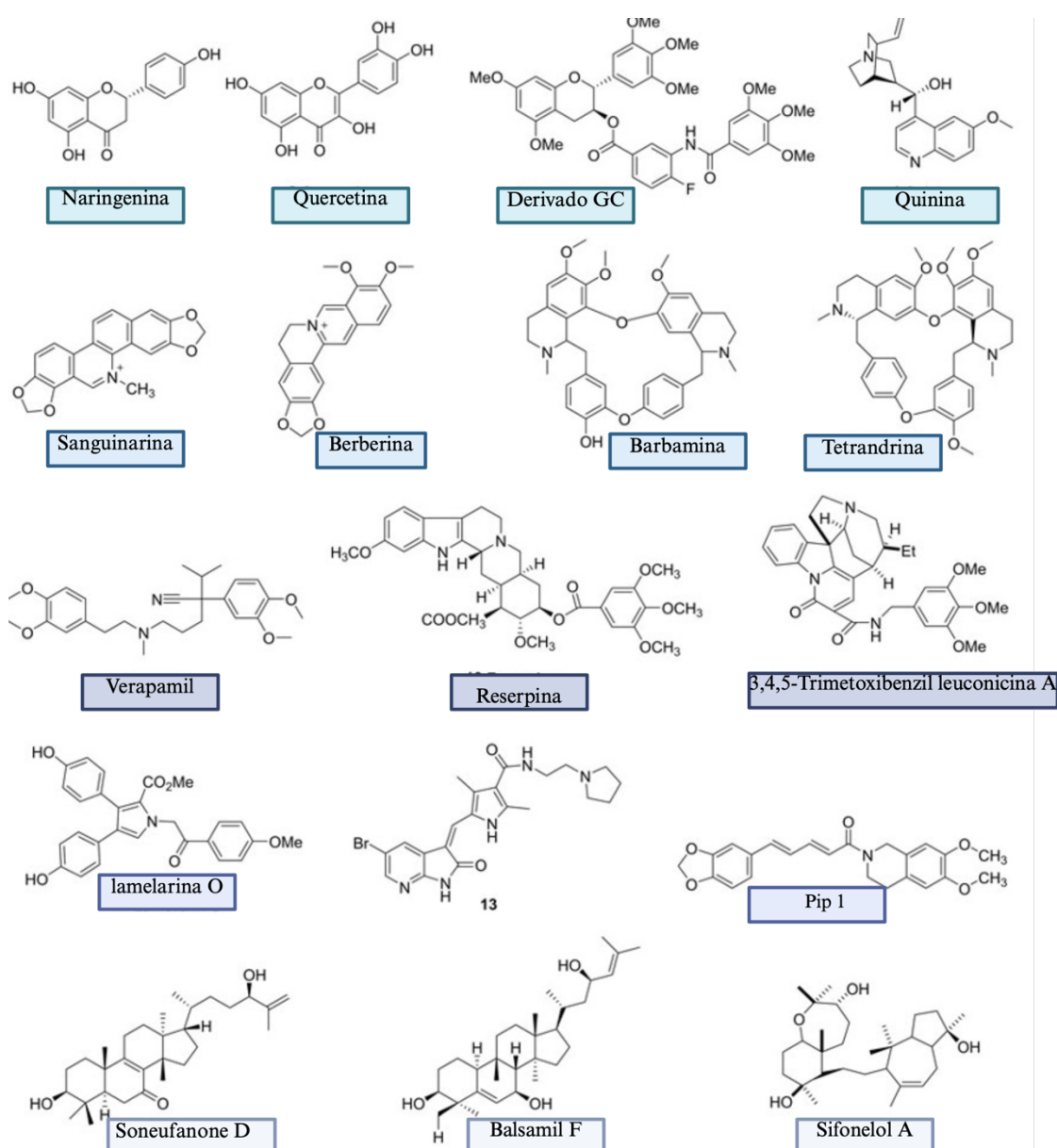
Fonte: adaptado de Hamed e colaboradores (2015) (Biorender.com)

### 1.7 Compostos moduladores da resistência a múltiplas drogas (MDR)

A maioria dos moduladores de MDR1, MRP1 e MRP2 compartilham algumas características químicas comuns, como estruturas de anéis aromáticos, um grupo amino terciário ou secundário e alta lipofilicidade (Mo et al., 2013; Rogan et al., 1984; Tsubaki et al., 2014a). No tratamento do câncer, o potencial uso terapêutico dos moduladores MDR1, MRPs é muito importante, porque a coadministração com medicamentos quimioterápicos tem o objetivo de reduzir a resistência multidrogas do câncer causada pelo transportadores. Devido à natureza do transportadores ABC como bomba de efluxo para proteção celular contra uma variedade de substâncias estruturalmente não relacionadas, seus substratos variam muito em tamanho, estrutura e função, desde moléculas pequenas, como cátions orgânicos, carboidratos, aminoácidos e alguns antibióticos, macromoléculas, como polissacarídeos e proteínas.

Nas últimas décadas, foram feitos numerosos esforços para resolver a resistência aos medicamentos causada pelas proteínas transportadoras ABC. Muitos dos inibidores do transportador ABC de primeira, segunda e terceira geração exibem altos níveis de toxicidade ou baixos efeitos inibidores potenciais (Adamska; Falasca, 2018). Os pesquisadores estão explorando inibidores mais potentes, concentrando-se principalmente em compostos sintéticos e produtos químicos de plantas naturais. As estruturas químicas dos inibidores ABC representativos são mostradas na Figura 9.

Figura 9- As estruturas químicas dos inibidores representativos dos transportadores ABC



Fonte: Adaptado de Xiao e colaboradores (2021)

O verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio, é um quimiossensibilizador clássico que pode aumentar o efeito antitumoral da DDP em diversas células cancerígenas, incluindo neuroblastoma e câncer de pulmão *in vitro* ou *in vivo*. Seus mecanismos relatados incluem a inibição da função de transporte do MDR1 ou a estimulação do transporte de GSH pelo MRP1 (HILL, 1986; WANG et al., 2011). Frente a isso, o verapamil é geralmente usado como controle positivo no teste de Rodamina 123 na reversão MDR de experimentos por citometria de fluxo (ZENG et al., 2020; Zhang et al., 2018).

Por outro lado, embora os inibidores da MDR (verapamil, zosuquidar e ciclosporina) e a terapia combinada de medicamentos anticâncer tenham apresentado alguns resultados clínicos promissores, atualmente nenhum medicamento de reversão de MDR foi aprovado para sensibilização significativa de células tumorais malignas devido aos seus efeitos colaterais prejudiciais (Engle & Kumar, 2022). O enorme impacto da quimiorresistência leva a extensos estudos de aspectos mecanísticos e estratégias para entender como a resistência se desenvolve nas células tumorais, bem como propor novos compostos capazes de modular ou evadir a MDR, especialmente no tratamento de pacientes com câncer metastático resistente a terapias tradicionais (Halder et al., 2022; Waghray & Zhang, 2018).

Em base nisso, vários compostos de fonte de produtos naturais estão sendo denominados como moduladores de quarta geração dos transportadores ABC, uma vez que se procura produtos naturais mais seguros e não tóxicos, a descoberta de inibidores da MDR1 a partir de recursos naturais está a ganhar cada vez mais interesse destacando os promissores como flavonoides, fenotiazinas, clorpromazinas, estilbenos, di e triterpenos, carotenoides e alcaloides nos últimos 30 anos (Xiao et al., 2021).

## 2. CAPÍTULO 1

### 2.1 INTRODUÇÃO

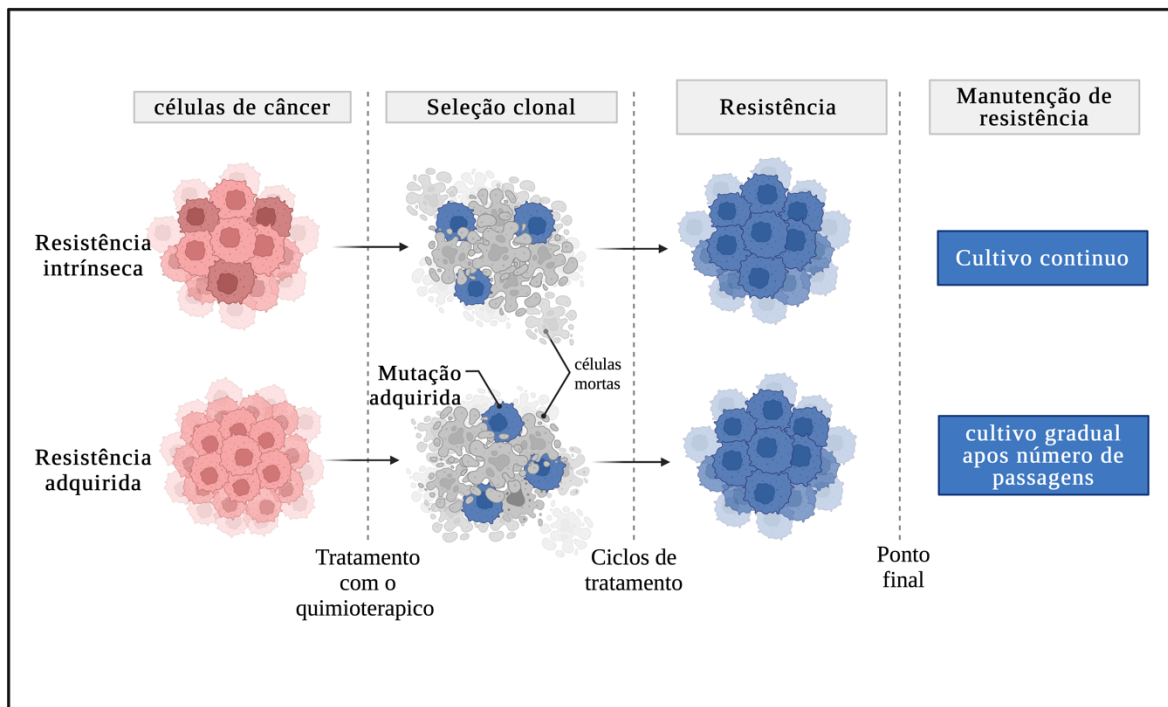
O desenvolvimento de linhagens celulares de câncer resistentes a medicamentos quimioterápicos é uma abordagem há muito tempo estabelecida para investigar os mecanismos de citotoxicidade e resistência a agentes quimioterápicos assim como triagem de novos moduladores de resistência. Uma das primeiras publicações a descrever o desenvolvimento de um modelo *in vitro* resistente a medicamentos anticâncer, foi publicado em 1971 (Riehm; Biedler, 1971). Posteriormente, linhagens celulares resistentes foram desenvolvidas a partir de células parentais de hamster chinês usando um aumento gradual na dose de tratamento com actinomicina D como resultado induziu uma resistência 2.500 vezes maior à droga do que a observada nas células parentais. Estas linhas celulares resistentes também apresentavam resistência cruzada a outros medicamentos quimioterápicos, como vimblastina e daunorrubicina.

Os estudos na área geralmente dão pouca ênfase à forma como as linhagens celulares resistentes aos medicamentos foram estabelecidas no laboratório perdendo o foco de compreender o problema de resistência e a reprodutibilidade do estudo. No entanto, o desenvolvimento de linhagens celulares resistentes a medicamentos pode levar de 3 a 18 meses em laboratório levando em consideração desde o começo a escolha da linhagem parental, concentrações que serão utilizadas, intervalos de tratamentos e otimização da concentração do substrato para a linhagem parental. Em esse sentido, linhas celulares resistentes a medicamentos como modelos biológicos *in vitro* podem ser desenvolvidas imitando as condições que os pacientes com câncer experimentam durante a quimioterapia e as linhas celulares apresentam resistência entre duas e vinte vezes em comparação com sua linha celular parental. As concentrações de medicamento administradas são baixas e uma estratégia de tratamento gradual é frequentemente usada quando as células se recuperam em meio livre de medicamento. Por outro lado, é comum ter dificuldade em desenvolver linhagens celulares resistentes a medicamentos estáveis para isso uma estratégia de seleção comparativa de múltiplas linhagens celulares ou múltiplos agentes quimioterápicos mitiga esse risco e fornece informações sobre quais agentes ou tipos de linhagens celulares desenvolvem resistência facilmente (Fang et al., 2017).



Um modelo biológico de resistência *in vitro* é informado por dados coletados da administração clínica do medicamento e geralmente tem um escalonamento mínimo da concentração de tratamento. É importante pesquisar como o agente quimioterápico é administrado no tratamento clínico do câncer quantidade de quimioterapia administrada por via intravenosa (IV mg/m<sup>2</sup>). Estes podem ser convertidos para microgramas por mililitro ou micromolar consultando estudos farmacocinéticos do medicamento onde é medida a concentração alcançada na corrente sanguínea. A quimioterapia administrada por via intravenosa é frequentemente administrada em ciclos em que o paciente recebe o medicamento semanalmente ou mensalmente. Uma estratégia de seleção gradual, onde as células são tratadas com medicamento e depois a população sobrevivente pode se recuperar em meio livre de medicamento, imita esse cenário clínico. Isto dá uma ampla faixa de dose para definir a relevância clínica da dose do medicamento utilizado no desenvolvimento de um modelo resistente ao medicamento (Figura 10).

Figura 10-Indução de linhagens celulares resistentes a medicamentos (MDR)



Fonte: Criada em biorender.com.

Cultivo contínuo: Algumas linhas celulares são cultivadas continuamente na presença de quimioterapia, a quimioterapia precisa ser removida para uma subcultura antes de ser usada em experimentos. Cultivo gradual: Alguns modelos são tratados com pulso repetido após um certo número de passagens ou semanas em cultura, uma vez que seu fenótipo resistente começa a desaparecer.

Em nesse contexto, a escolha de uma linhagem celular parental é muito importante, pois é a base de todos os experimentos subsequentes. A linhagem celular parental deve ser muito fácil de manter em cultura celular, uma vez que as variantes resistentes geralmente se tornam mais difíceis de crescer. Uma estratégia de seleção descrita anteriormente e a seleção gradual e contínua que produz linhas celulares de câncer de pulmão de células grandes resistentes à platina ou taxanos (H1299 e H460).

A cisplatina (DDP) é um dos medicamentos quimioterápicos relativamente eficazes para o tratamento do câncer de pulmão. No entanto, a recorrência e a metástase ainda ocorrem em muitos pacientes com câncer de pulmão após a quimioterapia inicial. A principal razão para o fracasso é que as células tumorais desenvolvem resistência a múltiplos medicamentos (MDR). Em base nisso, é importante desenvolver uma ferramenta laboratorial que ajude a compreender o MDR *in vitro* para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

A linhagem celular A549 consiste em células epiteliais basais alveolares hipotriploides. Esta linhagem celular foi desenvolvida pela primeira vez por D. J. Giard et al. em 1972, removendo e cultivando tecido de carcinoma pulmonar do tumor de um homem caucasiano de 58 anos. As células A549 são de natureza escamosa e são responsáveis pela difusão de água e eletrólitos através dos alvéolos. Quando cultivadas *in vitro*, estas células crescem como uma monocamada, aderindo ao frasco de cultura mostrando uma morfologia tipo epitelial. Além disso, a linha celular A549 é uma linha celular humana hipotriploide com o número modal de cromossomos de 66, ocorrendo em 24% das células. É comum ter números modais de 64 e 67 com ploidias mais elevadas ocorrendo com uma taxa pouco frequente (0,4%). Destaca-se que a linhagem A549 expressa em baixos níveis os transportadores ABC o que facilita realizar a sua indução de uma super expressão deles o que se apresenta como vantagem da linhagem celular.

Além disso, a heterogeneidade do modelo biológico *in vitro* resistente a DDP produzido permite a exploração das proteínas MDR1, MRP1 e MRP2, refletindo a heterogeneidade que pode ocorrer na resistência aos medicamentos por isso é importante avaliar e caracterizar a linhagem resistente como base inicial dos experimentos subsequentes, tendo como base os parâmetros farmacocinéticos de DDP.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver um modelo biológico *in vitro* resistente a cisplatina a partir da linhagem parental A549 para triagem de compostos moduladores de resistência.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Induzir o modelo biológico *in vitro* da linhagem celular cancerígena resistentes à Cisplatina (A549/A549DDP20) por meio de concentração gradiente a concentração continua para de triagem de moduladores de MDR *in vitro* e avaliar o índice de resistência das linhagens celulares.
2. Investigar alterações morfológicas na linhagem A549DDP20 após termino da indução de resistência com cisplatina.
3. Determinar tempo de duplicação da linhagem resistente A549DDP20 comparada a linhagem parental A549.
4. Avaliação da expressão de proteínas MDR1, MPR1, MRP2 das linhagens celulares A549 e A549DDP20.
5. Definir as mudanças no perfil citogenético da linhagem resistente comparada à linhagem parental.

## 4. MATERIAS E METODOS

### 4.1 Linhagens celulares e condições de cultura

As linhagens tumorais e não tumorais utilizadas foram cultivadas em meio IMDM suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Acompanhando diariamente seu crescimento celular com a utilização do microscópio invertido. Células foram utilizadas em confluência de 80-90%.

Para a avaliação da citotoxicidade *in vitro* foram utilizadas diferentes linhagem celulares que estão descritas na tabela 1.

Tabela 1-linhagens celulares utilizadas para ensaio de citotoxicidade *in vitro*

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Tipo histológico</b>	<b>Origem</b>	<b>[ ] cél/mL</b>	<b>Fonte</b>
<b>MRC-5</b>	Não tumoral de pulmão	Humana	4,0×10 <sup>4</sup>	Banco do rio de Janeiro
<b>A549</b>	Carcinoma de pulmão		7,5×10 <sup>4</sup>	NCI

Tabela 1- Linhagens celulares permanentes do laboratório de oncologia experimental. [ ] =concentração, cél/mL =Células/mililitro, Instituto Nacional de câncer-USA (NCI)

### 4.2 Controles positivos utilizados

Inicialmente, foi utilizado a Cisplatina (DDP) (Sigma aldrich) como substrato indutor de quimiorresistência *in vitro*. O DDP foi dissolvido em solução salina 0,9% da mesma forma, verapamil utilizado como agente sensibilizante. Por outro lado, carboplatina, gefinitib, Erlotinib e taxol foram diluídos em DMSO. Os compostos foram preparados em uma concentração final de 10 mM e permaneceu sob refrigeração a 4 °C (Tabela 2).

Tabela 2- Quimioterápicos e controles positivos utilizados

<b>No.</b>	<b>Composto</b>	<b>Veículo</b>	<b>[ ] mM</b>
<b>1</b>	Cisplatina		10,00

2	Verapamil	solução salina 0,9%
3	Carboplatina	DMSO
3	Gefinitib	
5	Erlotinib	
6	Taxol (Paclitaxel)	

Tabela 2- [] concentração, mM=milimolar, dimetilsulfóxido (DMSO)

### 4.3 Desenvolvimento de linhagem resistente e condições de cultura

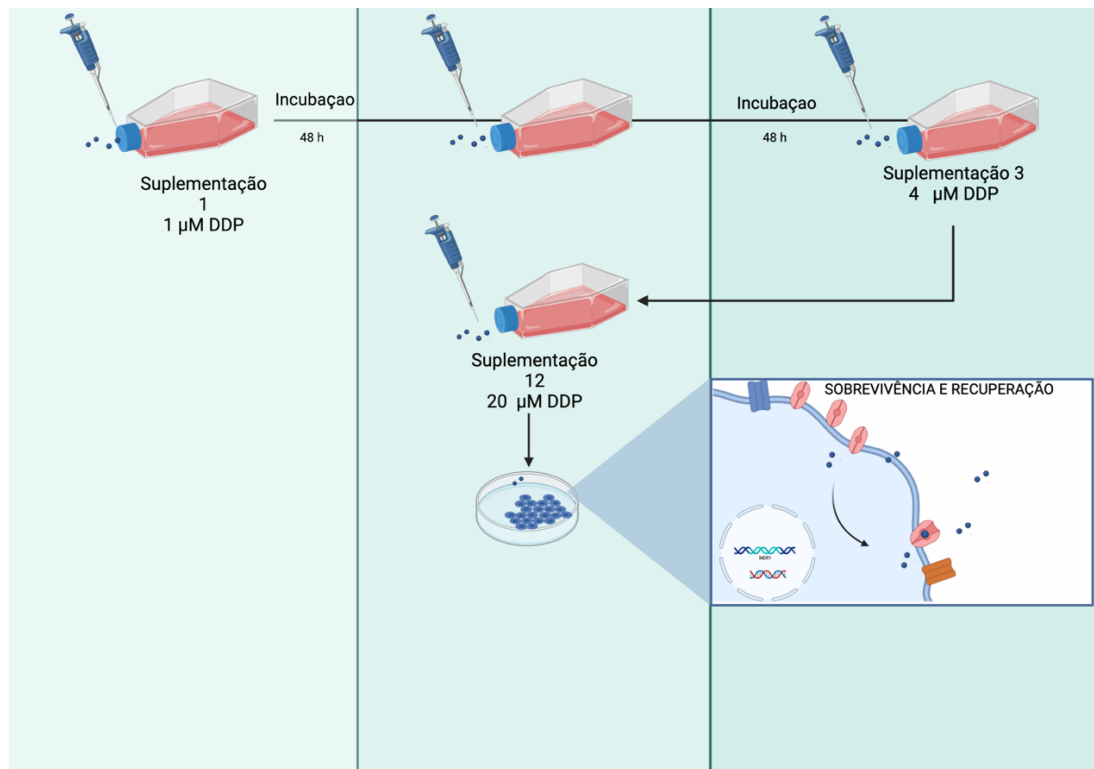
A linhagem celular de carcinoma de pulmão (A549) foi mantida em Meio IMDM (Sigma-aldrich) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FCS) (Gibco BRL, Grand Island, NY) e cultivadas a 37 ° C em uma umidificada atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A linhagem celular de carcinoma de pulmão resistente a cisplatina (A549DDP20) foi induzida por co-incubação de longo prazo a partir de linhagem celular A549 parental em solução de cisplatina (DDP) em concentrações gradientes e contínuas.

Inicialmente, as células A549 foram co-incubadas com 1 µM de DDP por 48 horas e, em seguida, as células mortas foram removidas do meio de cultura. Posteriormente, as células A549DDP foram cultivadas no meio de cultura de células fresco e deixadas 24-48 horas para recuperar após tratamento até atingir a confluência de 80-90% na garrafa de 75cm<sup>2</sup>. Posteriormente as células foram co-incubadas com 2µM de DDP e a concentração foi acrescentada no dobro até chegar na suplementação de 20µM da mesma forma descrita anteriormente.

A definição de tal dosagem na linhagem A549 foi baseada a partir da concentração IC<sub>50</sub> de DDP determinada previamente (10,62 µM) após 72 horas de tratamento. Em contraste, o DDP tem um perfil farmacocinético bifásico com mais de 90% do fármaco distribuição via proteínas plasmáticas em questão de poucas horas, mas a depuração leva aproximadamente 30 dias. Por esse motivo as concentrações são inicialmente em concentração gradiente. Em base nisso, se designaram as concentrações 1 µM como a IC<sub>4,7</sub> como concentração inicial (Concentração subletal) e a IC<sub>100</sub> de 20µM que representa as concentrações plasmáticas da DDP na clínica 2µg/mL-6µg/mL respectivamente. Nesse contexto, receberam o nome de

A549DDP20. A figura 11 apresenta de maneira esquemática, cada uma das suplementações de tratamento com concentrações de 1-20 $\mu$ M de cisplatina.

Figura 11-Esquema de indução das células de câncer de pulmão resistentes a cisplatina (A549DDP20)



Fonte: Própria do Autor (Biorender.com)

Durante este procedimento, algumas células sobreviventes proliferaram e recolonizaram as culturas, produzindo uma cepa resistente cisplatina. A cultura repetida e a passagem de células induziram a produção de células resistentes em concentrações gradualmente aumentadas durante 6 meses, até obter células A549DDP20 posteriormente as células foram mantidas em indução contínua com 20  $\mu$ M DDP por 3 meses. Além disso, 20  $\mu$ M DDP será utilizado para suplementação para manter sua resistência e estabilidade (Liu et al., 2017). As células resistentes a DDP foram cultivadas sem DDP, congeladas e armazenadas. Decidiu-se, então, avaliar as mudanças nos perfis de ambas as linhagens de forma a se verificar se realmente as células estavam mais resistentes do que quando comparadas à sua versão parental. As células congeladas foram recuperadas e submetidas aos experimentos descritos abaixo.

*Princípio de teste*

O alamar Blue é um reagente de ensaio de viabilidade celular que contém o corante indicador azul permeável, não tóxico e fracamente fluorescente chamado resazurina. Este é um reagente confiável e estabelecido que está disponível desde 1993. É um método rápido, sensível e barato. A resazurina é usada como um indicador de oxidação-redução (REDOX) que sofre alteração colorimétrica em resposta à redução metabólica celular. A forma reduzida, resorufina, é rosa e altamente fluorescente, e a intensidade da fluorescência produzida é proporcional ao número de células vivas que respiram (Rampersad, 2012).

#### *Procedimento experimental*

As células A549 foram colhidas por tripsinização e semeadas em  $7,5 \times 10^4$  cél/mL em placas de 96 poços, após 24 horas foram incubadas com DDP para determinação da  $IC_{50}$  no tempo de 72 horas. As células A549DDP20 foram colhidas por tripsinização no final de suplementações com a DDP e esperando 1-2 passagens para seu uso, em seguida, foram semeadas em  $7,5 \times 10^4$  cél/mL em placas de 96 poços e incubadas durante a noite. Posteriormente, foram incubadas 50-200  $\mu$ M de DDP como concentração maior da curva durante 72 horas sendo realizado após cada suplementação até o final da indução para poder monitorar a quimioresistência induzida. O índice de resistência (IR) foi calculado pela razão do  $IC_{50}$  de linhas celulares resistentes sobre  $IC_{50}$  das linhas celulares parentais. Quimioresistência é definida como  $IR \geq 2$  (Govindan et al., 2015). Para o ensaio foi adicionado 20  $\mu$ L de solução stock 10 mg/mL de alamar blue (31,2  $\mu$ g/mL) em cada poço da placa. As placas foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5%  $CO_2$  durante 4 h. A leitura da fluorescência foi realizada no leitor de microplaca PerkinElmer nivo num comprimento de onda de 580/610nm.

#### *Análise de dados*

As substâncias foram avaliadas em diluições seriadas, em três experimentos independentes, em triplicatas. A partir dos valores de fluorescência obtidos, as concentrações inibitórias médias ( $CI_{50}$ ) foram calculadas com intervalos de confiança de 95% ( $IC_{95\%}$ ) por meio de regressão não linear, utilizando o software Prisma versão 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

#### 4.4 Avaliação da morfologia celular

A observação das células A549 e A549DDP20 foi realizada por microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) para mostrar se há diferenças morfológicas entre os grupos da linhagem parental e linhagem resistente no aumento 10X, observado sob microscópio de contraste de fase.

#### 4.5 Curvas de crescimento e o tempo de duplicação (Td)

##### *Princípio do teste*

Para avaliar o se o crescimento celular da linhagem resistente foi alterado foram realizados o ensaio de doubling time (Td) e curvas de crescimento sendo possível verificar a taxa de crescimento para que a população dobre sua quantidade. Para a determinação da concentração de células foi utilizado o corante azul de tripan. Ele permite diferenciar células viáveis de não viáveis, pois as viáveis são impermeáveis a este corante, uma vez que sua penetração na célula indica a perda da integridade de sua membrana (Esmeralda et al., 2002).

##### *Procedimento experimental*

Suspensões de células foram preparadas a partir das células em fase de crescimento exponencial. Aliquotas contendo  $1 \times 10^4$  células A549 e A549DDP20 foram semeadas em placas de 24 poços (KASVI K12-024) com 1 mL de meio. Posteriormente foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Três poços foram usados para cada determinação, e três contagens de células para cada poço de cada linha de células foram feitas a cada 24 horas durante 7 dias, utilizando o azul de tripan contadas em câmara de Neubauer.

##### *Análise de dados*

A partir dos dados obtidos foram analisados os valores de concentração de células por mL. As curvas de crescimento celular foram traçadas com o tempo de cultura no eixo X e as contagens de células médias / por dia no eixo Y, utilizando o software Prisma versão 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O tempo de duplicação (Td) de cada linha celular



foi contado de acordo com o: Cite this website as following: Roth V. 2006 Doubling Time Computing, Available from: <http://www.doubling-time.com/compute.php>

#### **4.6 Avaliação da expressão proteica por Western Blot**

##### *Princípio do teste*

A expressão das proteínas MDR1, MRP1, MRP2 foi avaliada por ‘imunoblotting’ nas células A549 e A549DDP20. Immunoblotting ou western blot, permite a detecção de um antígeno de proteína imobilizado no suporte de membrana de retenção de proteína, como fluoreto de polivinilideno (PVDF). A detecção da proteína de interesse depende da ligação de um anticorpo que reconhece especificamente a proteína de interesse exposta na membrana (Litovchick, 2020).

##### *Procedimento experimental*

###### Extração de proteínas

As células A549 e A54PDDP20 foram plaqueadas e tratadas com o veículo (Solução salina), com EB-PA 5, 10 e 37 $\mu$ M, verapamil 10 e 20 $\mu$ M e cisplatina 20 $\mu$ M (48 h) isolados por 24 horas e em combinações durante 72 horas de incubação em total. Posteriormente as células foram utilizadas raspadores de células para as remoções e centrifugadas a 2000 rpm/4°C/5 min e o pellet foi lavado duas vezes com PBS gelado. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 300  $\mu$ L de tampão de lise (gelado) RIPA (Lise celular) (Milipore) 1X acrescido de um coquetel de inibidores de proteases (1:100 v/v). As amostras foram colocadas em gelo por 15 minutos e homogeneizados a cada 5 minutos (Up/down) e sonicadas por 1 min 3x com intervalo de 2 minutos no gelo. Ao final, as amostras foram centrifugadas a 14000 G por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, separado em alíquotas e armazenado a -80°C.

###### Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas totais extraídas das células foi realizada por meio de método colorimétrico com o kit DC Protein Assay (BioRad Laboratories), utilizando o método de Bradford. Para isso, uma curva padrão de BSA (0,2-2 mg/mL; Sigma) diluída em tampão

RIPA completo foi utilizada para determinar a concentração de proteína. O tampão RIPA completo foi utilizado para marcar o branco experimental. Em seguida, 5  $\mu$ L de cada amostra foi adicionado em triplicata em placa de 96 poços. Foram adicionados em todos os poços 25  $\mu$ L de reagente A' (20  $\mu$ L de reagente S + 1 mL de reagente A) seguido de 200  $\mu$ L de reagente B (BioRad Laboratories). As amostras foram incubadas por 10 minutos no escuro sob agitação leve e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda na faixa de 650 nm. A curva de BSA foi gerada por regressão linear no Excel, sendo plotado um gráfico da absorbância versus quantidade de proteínas. Os valores de absorbância obtidos de cada amostra foram aplicados à equação da reta para determinar a concentração de proteína de cada amostra.

#### Eletroforese em gel de poliacrilamida

A separação das proteínas totais baseada no peso molecular foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em um sistema vertical (BioRad, modelo miniPROTEAN® Tetra Cell) (Towbin; Staehelin; Gordon, 1979). O gel de resolução foi confeccionado para uma concentração final de 8% em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 (BioRad Laboratories). O gel de empilhamento foi colocado sobre o gel de 8%, com concentração final de 8% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 (BioRad Laboratories). O marcador de peso molecular Full-Range Rainbow Marker (12-250 kDa; GE Healthcare) foi usado sempre no primeiro poço da esquerda para monitorar a separação das proteínas. Foi aplicado nos poços do gel de concentração 20  $\mu$ g de proteína total de cada amostra, carregada com o tampão de amostra 4X. A corrida de eletroforese foi realizada sob voltagem constante de 120 V e amperagem livre (para duas placas; fonte elétrica PowerPac™, modelo HCPower Supply) à temperatura ambiente, utilizando um tampão de corrida para eletroforese. O tempo de corrida variou entre 1:40 horas.

#### Eletrotransferência em semi-seco

As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de PVDF Hybond-P (GE Healthcare). Para isso, o gel foi colocado em contato com a membrana previamente lavada em metanol entre esponjas e papéis de filtro banhados na solução de transferência. A eletrotransferência foi realizada pelo método de transferência em semi-seco a 25 V e

amperagem livre por 30 minutos a temperatura ambiente fonte elétrica PowerPac™, modelo HCPower Supply).

#### Imunodeteccção e Quimioluminescência:

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de leite desnatado 2% em TBS-T por uma hora sob agitação constante, a fim de bloquear ligações proteicas inespecíficas. Após o período de incubação, foram realizadas três lavagens com TBS-Tween 0,2% (TBS-T) de 5 minutos. As membranas foram incubadas overnight a 4°C com os anticorpos primários diluídos em solução de Leite 2% em TBS-T (anticorpos primários, MDR1, MRP1, MRP2, GAPDH e B-tubulina). Após o mesmo processo de lavagem realizada anteriormente com TBS-T as membranas foram incubadas por uma hora com o anticorpo secundário ligado à peroxidase (HRP) diluído em solução de leite desnatado 2% em TBS-T sob agitação. As membranas foram então novamente lavadas e a revelação foi realizada utilizando peróxido de hidrogênio e luminol (kit Clarity and Clarity Max Western ECL Blotting Substrates - BioRad). As membranas foram fotografadas por um captor de imagens (ibright) utilizado para captação de Quimioluminescência gerado pelo método de detecção de bandas. As imagens foram editadas no próprio programa para sobreposição de imagem das bandas e do marcador e, em seguida, foram quantificadas utilizando o programa Image J. Os valores de quantificação foram obtidos a partir da normalização dos dados com base na quantificação de GAPDH ou B-tubulina (anticorpo de referência experimental).

#### **4.7 Ensaio citogenético**

##### *Princípio do teste*

O teste citogenético é o exame dos cromossomos para determinar anormalidades cromossômicas, como aneuploidia e anormalidades estruturais. É utilizado a coloração de Wright, uma coloração policromática composta por uma mistura de eosina e azul de metileno. Como a coloração de Wright é à base de metanol, não requer uma etapa de fixação antes da coloração. A eosina é um corante aniônico ácido e o azul de metileno é um corante catiónico básico. Quando diluído em água tamponada, ocorre ionização. A eosina cora os componentes básicos. O azul de metileno cora componentes celulares ácidos, como ácido nucleico e grânulos

basofílicos, em vários tons de azul. Os componentes neutros das células são corados por ambos os componentes do corante, produzindo cores variáveis.

### *Procedimento experimental*

A obtenção de células metafásicas foi realizada de acordo com o procedimento padrão como descrito por Castro-Gamero et al (2013). Após o tempo de cultura, as células foram expostas a uma concentração final de colchicina de 5 ng/ml e incubadas a 37°C por 3 horas. Após o tempo de incubação, as células, quando aderentes, foram desprendidas usando uma solução de tripsina/EDTA. Em seguida, a suspensão obtida foi centrifugada por 10 minutos a 1200 rpm.

O tratamento hipotônico foi realizado com 0.075 M KCL por 15 minutos a 37°C. Posteriormente foi realizado 3 lavagens com metanol:ácido acético na concentração 3:1. As lâminas foram preparadas por 2-3 dias, expostas a digestão enzimática com 1% tripsina e coradas com wright para a obtenção de Bandas. A análise citogenética foi realizada de acordo com os critérios da ISCN (2020).

### *Análise de dados*

Foram analisadas 20 metafases de cada células utilizando o sistema de captura de imagem Cytovision para análise cromossômica.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Ensaio de citotoxicidade alamar blue

#### Indução e monitoramento da linhagem celular resistentes a Cisplatina A549DDP20.

O modelo de células resistentes a cisplatina desenvolvido no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), foi realizado de acordo com os protocolos anteriormente mencionados (Liu et al., 2017; Mcdermott et al., 2014). As células-filhas resistentes sobreviventes foram comparadas com as células parentais sensíveis usando ensaio de proliferação celular alamar blue após 72 horas de tratamento como protocolo de monitoramento de indução de resistência após suplementações.

Uma sublinhagem resistente a cisplatina derivada da linhagem celular sensível parental A549 foi estabelecida com sucesso por indução gradual com cisplatina durante um período de 6 meses e indução continua por 3 meses, resultando na A549DDP20, que é mantida em cultivo utilizando meio completo com 20  $\mu\text{M}$  de cisplatina. O Índice de resistência final da A549DDP20 final calculado foi de 16,13. Resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3- Valores de  $\text{CI}_{50}$  de Cisplatina em linhagens de células de câncer de pulmão parental e resistente à cisplatina.

<b>Linhagem celular</b>	<b>N °S</b>	<b>Concentração <math>\mu\text{M}</math></b>	<b><math>\text{CI}_{50}</math> IC 95% DDP <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>IR</b>
<b>A549</b>	-	-	10,62 (9,525 – 11,84)	-
<b>A549DDP20</b>	3 °	4	31,32 (25,14 -39,03)	<b>2,95</b>
	4°	6	35,23 (28,23 – 43,98)	<b>3,32</b>
	6°	10	42,09 (36,05 -49,15)	<b>3,96</b>
	10°	18	72,55 (52,7 – 92,59)	<b>6,83</b>
	11°	20	65,71 (46,95 – 99,99)	<b>6,19</b>

12°	20	171,3 (137,9 -212,7)	<b>16,13</b>
-----	----	-------------------------	--------------

Tabela 3- Ensaio de citotoxicidade de alamar blue. Valores de IC<sub>50</sub> (µM) cisplatina (DDP) após 72 horas de tratamento nas linhagens A549/A549DDP20. Foram calculadas com intervalos de confiança de 95% (IC 95%) por meio de regressão não linear, utilizando o software Prisma versão 9.0. IR (Índice de resistência) (IC<sub>50</sub> Linhagem resistente/ IC<sub>50</sub> linhagem parental), \* N ° S Número de suplementação com o substrato.

Posteriormente as células A549DDP20 foram utilizadas para ensaios de citotoxicidade para avaliar o valor de CI<sub>50</sub> pós-exposição da resistência cruzada com outros quimioterápicos *in vitro* após 72 horas de tratamento para pode ser considerado como modelo de resistência a múltiplas drogas (MDR). Observou-se resistência cruzada com a doxorrubicina e paclitaxel com um índice de resistência de 5,32 e 36,06 respectivamente. Além disso, não foi observada resistência cruzada com carboplatina e gefinitib (IR < 2). Os resultados estão apresentados na tabela 4.

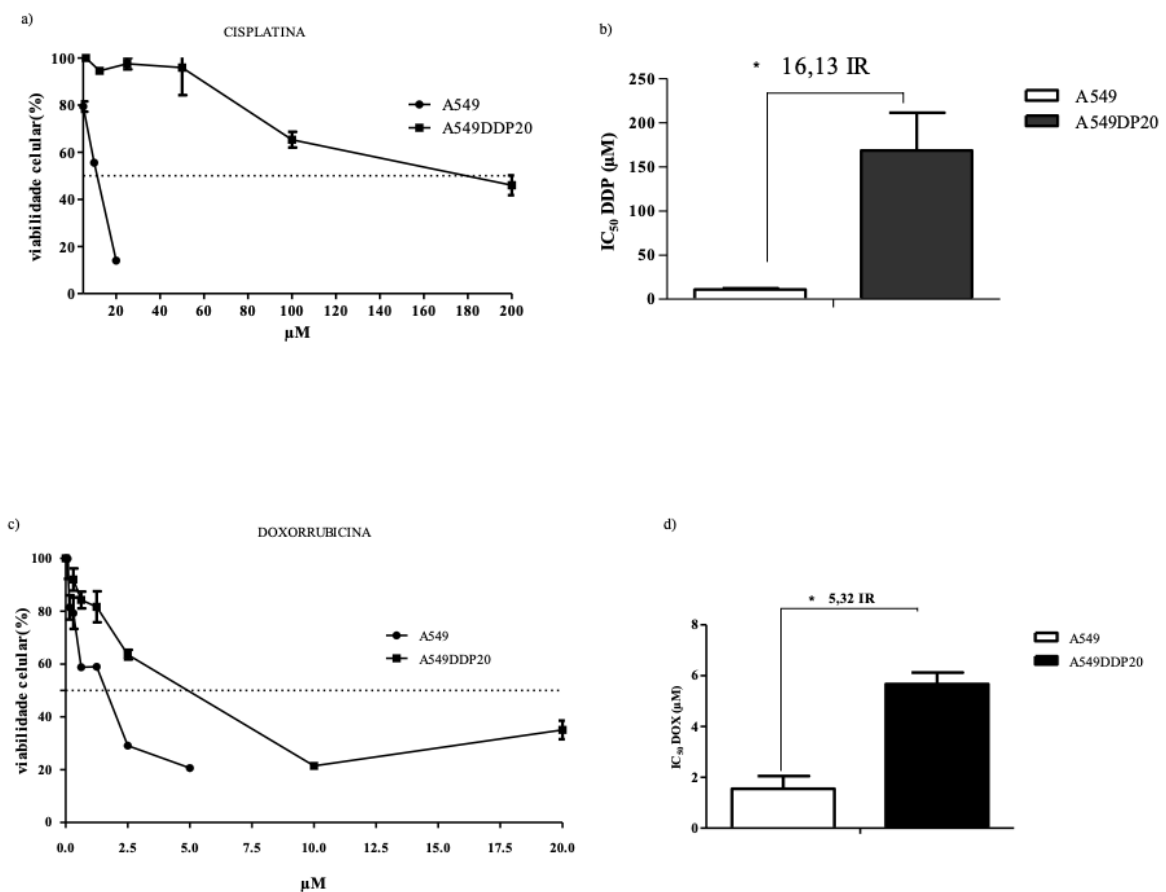
Tabela 4-Valores de CI<sub>50</sub> de quimioterápicos em linhagens de células de câncer de pulmão parental e resistentes à Cisplatina após 72 horas de tratamento.

<b>Linha celular</b>	<b>Amostra</b>	<b>CI<sub>50</sub> µM IC 95%</b>	<b>IR</b>
<b>A549</b>	DDP	10,62 (9,53 – 11,84)	-
	Dox	1,52 (1,12-2,06)	-
	Tax	0,77 (0,41-1,45)	-
	Carb	>50	-
	Gef	37,46 (32,62 -43,00)	-
<b>A549DDP20</b>	DDP	171,3 (137,9 -212,7)	<b>16,13</b>
	Dox	6,97 (4,68-10,55)	<b>5,32</b>
	Tax	27,77 (10,34-74,20)	<b>36,06</b>
	Carb	>50	-
	Gef	35,79 (31,69- 40,42)	<b>0,95</b>

Tabela 4. Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ), DDP(Cisplatina), Dox (Doxorrubicina), Carb (Carboplatina), Gef (Gefinitib)tax (paclitaxel), após 72 horas de tratamento. IR (índice de resistência) ( $IC_{50}$  Linhagem resistente/  $IC_{50}$  linhagem parental). Valores de concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear obtidos pelo Programa GraphPad Prisma versão 9.0, a partir de 2 experimentos independentes realizados em duplicata após 72 h de incubação.

Nesse contexto, quando as células cancerosas desenvolvem resistência aos quimioterápicos, uns dos possíveis mecanismos frequentemente presente é a glicoproteína P, bomba de efluxo dependente de ATP (MDR1, P-gp1 ou ABCB1). A Pgp-1 pode efluir uma ampla gama de medicamentos contra o câncer; sua expressão confere resistência cruzada, denominada "resistência a múltiplas drogas" (MDR). Na figura 12 observamos a comparação da viabilidade celular entre as linhagens celular parental e resistente observando 3 possíveis substratos da bomba de efluxo, mostrando o nosso modelo clínico como um fenótipo para estudo de novos compostos *in vitro*.

Figura 12-Viabilidade celular e de  $CI_{50}$  nas linhagens A549 e A549DDP20 após o tratamento de 72 h



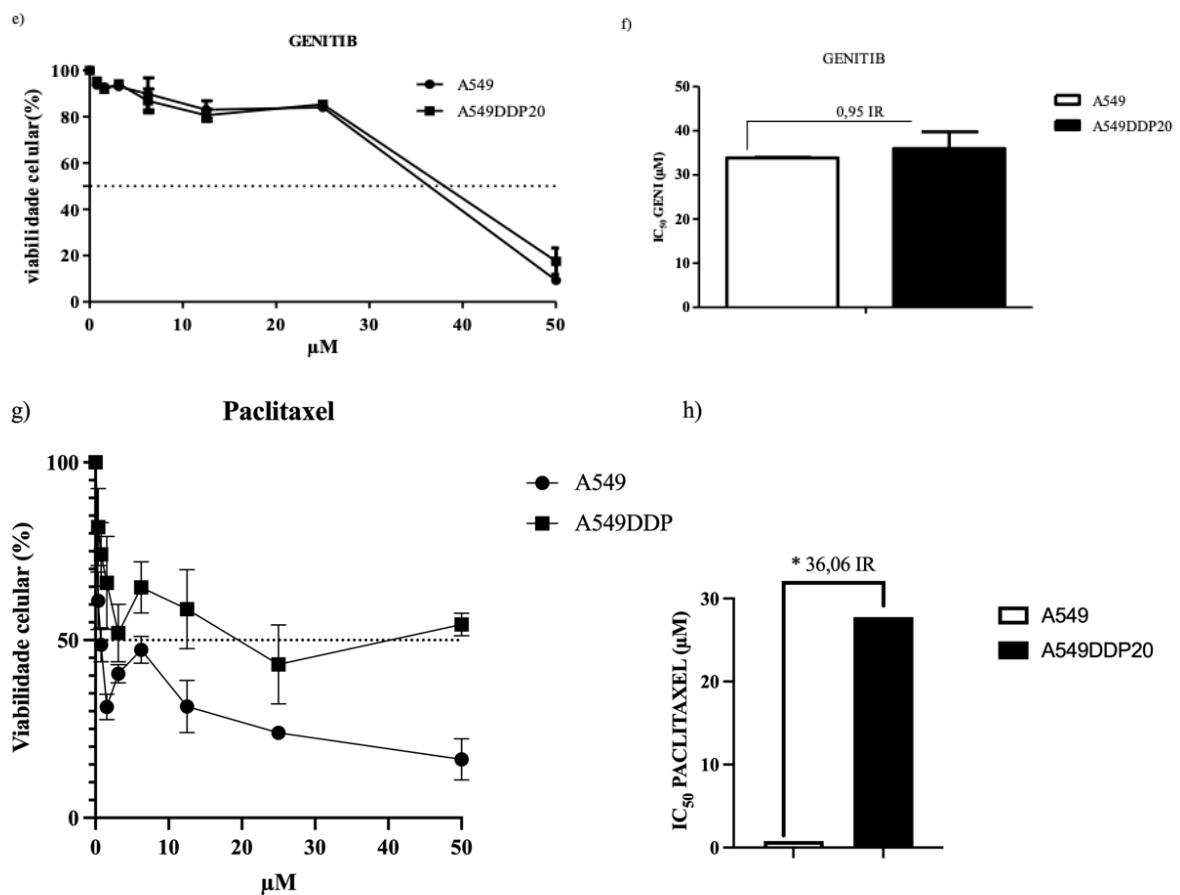


Figura 12. As células tumorais tratadas com DDP demonstraram maior resistência a três quimioterápicos. Os valores de  $IC_{50}$  das células resistentes a DDP geradas a partir de células A549 parentais (a-d) após tratamento sequencial com a combinação das quimioterápicos, foram avaliados por ensaios alamar blue. A viabilidade destas células foi avaliada contra o tratamento com (a-b) cisplatina, (c-d) Doxorubicina, (d- f) g gefinitib e paclitaxel (g- h). A linhagem celular resistente, A549DDP20, demonstraram um aumento significativo nos valores de  $IC_{50}$  conforme analisado pelo software GraphPad Prism 9.0. Os experimentos foram realizados em duplicata ( $P < 0,05$ , em comparação com as células parentais);  $IC_{50}$ , metade da concentração inibitória máxima; IR, índice de resistência.

## 5.2 Características morfológicas das células A549 e A549DDP20

As células A549 (Figura 13 a) representa uma ilhota de células em contato com uma morfologia intermediária entre células epiteliais e fibroblastos. Essas células têm morfologia clássica de fibroblastos e aumentam a motilidade. A linhagem celular A549DDP20 em diferentes campos (Figura 13 b, c e d), foram o tamanho das células A549DDP20 foi maior do que as células A549. Especialmente, as células A549DDP20 a forma das células foi observada para ser mais irregular o citoplasma e perder adesão entre uma célula e outra. Além disso,



observou-se uma população heterogênea entre células proliferantes e células gigantes poliploides paralisadas pela proliferação.

Figura 13-Morfologia da linhagem celular A549 e A549DDP20

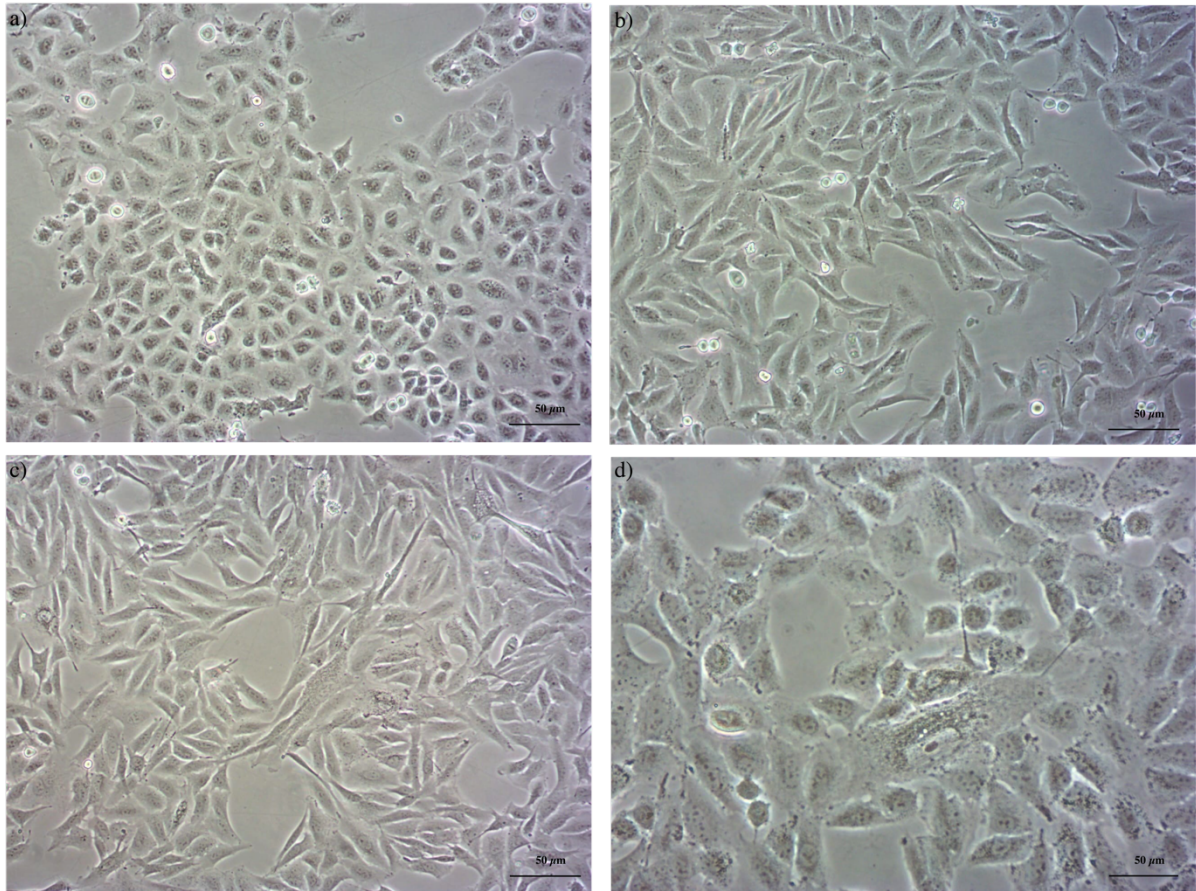


Figura 13- a) Linhagem celular parental (A549) e b, c, d) Linhagem celular resistente a Cisplatina (A549DDP20) células mostradas sob ampliação de 10X por microscopia invertido.

### 5.3 Curvas de crescimento e tempo de duplicação (Td)

A curva de crescimento celular foi traçada com o tempo de cultura no eixo X e as contagens de células médias / por dia no eixo Y (Figura 14a). Em seguida, foi determinado as características de proliferação de A549DDP20. A curva de crescimento demonstrou que a linhagem A549DDP20 proliferou lentamente com o atraso do pico de divisão e o tempo de duplicação prolongado de  $31,91 \pm 0,75$  horas em comparação com a linhagem A549  $19,24 \pm 0,37$  horas, o que foi realmente consistente com as características de proliferação das linhas celulares resistentes aos medicamentos (Figura 14b).

Figura 14-Curvas de crescimento das células e o tempo de duplicação da população de células A549 e células A549DDP20.

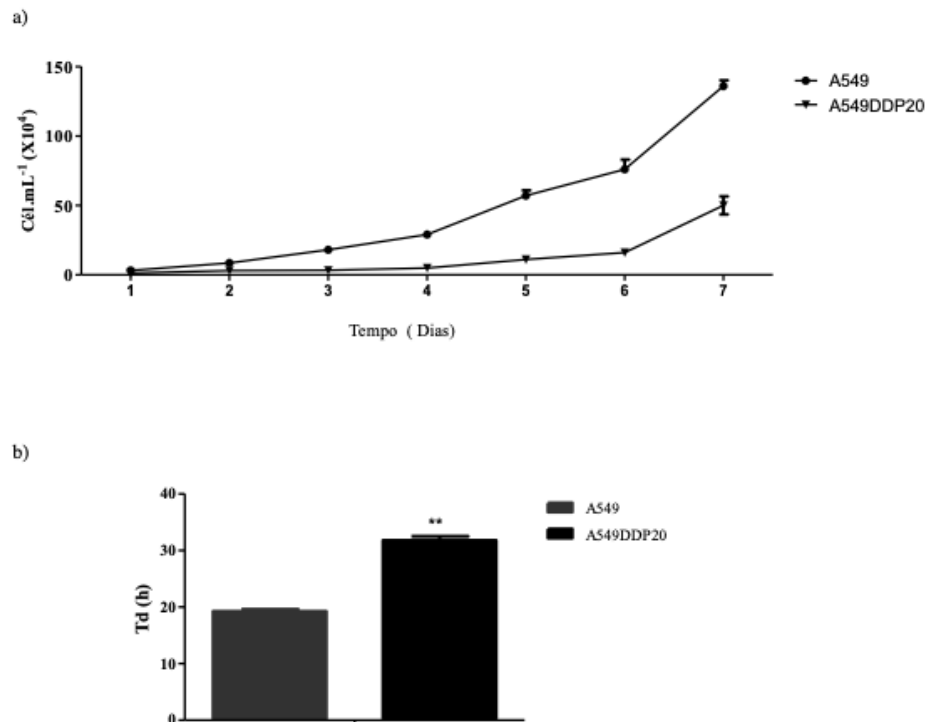


Figura 14- a) As curvas de crescimento celular foram traçadas com o tempo de cultura no eixo X e as contagens de células médias / por dia no eixo Y. b) Valores de tempo de duplicação obtidos pelo programa Roth V. 2006 Doubling Time Computing. Dados obtidos pelo Programa GraphPad Prisma versão 5.0, a partir de 2 experimentos independentes realizados em duplicata após 7 dias de incubação.

#### 5.4 Determinação da expressão dos transportadores ABC nas linhagens A549 e A549DDP20 por western blot

Os resultados anteriores sugeriram fenótipo MDR para a linhagem A549DDP20 quando comparada a sua linhagem parental (A549). Posteriormente, tentou-se elucidar se transportadores da família ABC estariam atuando no processo de resistência a múltiplas drogas na linhagem A549DDP20. Frente a isso, verificou-se a expressão de proteínas relacionados à resistência a drogas: P-glicoproteína (MDR1) e MRP1 e proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas (MRP1 e MRP2) Utilizando anticorpos anti-MDR1, anti-MRP1 e anti-MRP2 por Western blot. Foi observado que a linhagem A549DDP20 expressa as três proteínas MDR1,

MRP1 e MRP2 quando comparadas com a linhagem A549 (Figura 15). Em contraste, o nível de expressão MDR1 na linhagem celular resistente foi altamente expressa (6,039) e na linhagem parental pouco detectável (0,603) (Figura 15 a). Além disso, apresenta alta expressão das proteínas MRP1 e MRP2 com 6,332 e 4,821 correspondentemente. Por outro lado, na linhagem parental observou-se uma menor expressão relativa para as proteínas MRP1 (2,596) e MRP2 (3,289). Os resultados sugerem que um dos principais mecanismos de resistência adquirida a DDP na linhagem celular A549DDP20 envolve a regulação positiva das proteínas MDR, responsáveis por transportador de efluxo de drogas.

Figura 15-Expressão dos transportadores ABC nas linhagens A549 e A549DDP20

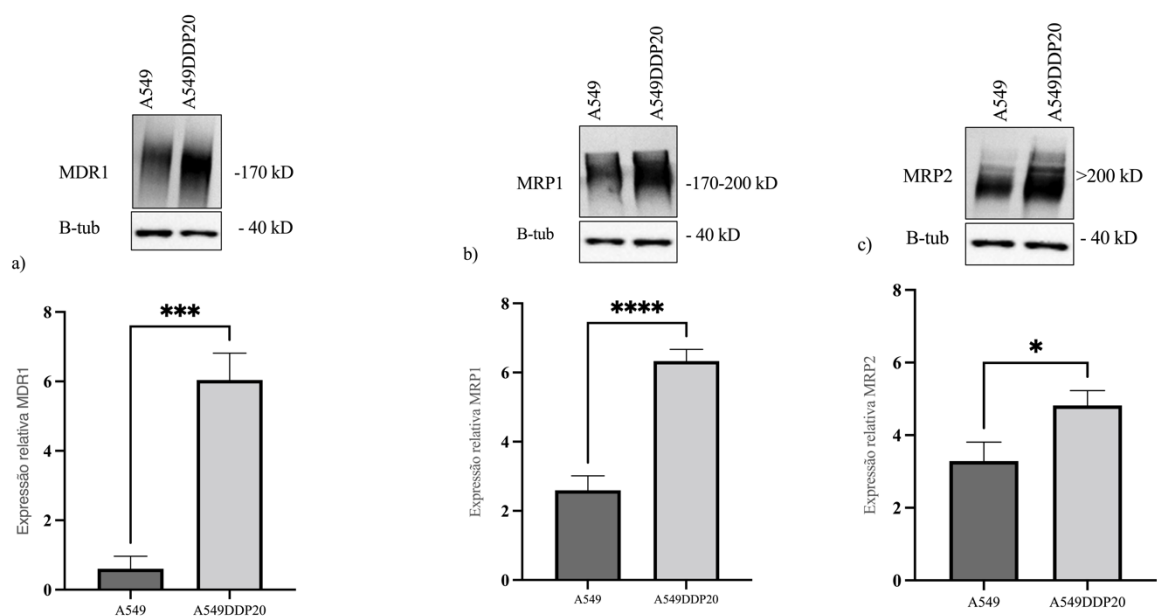


Figura 15- Expressão dos transportadores ABC nas linhagens A549 e A549DDP20. Expressão relativa MDR1, MRP1 e MRP2. O western blot foi marcado com anti-MDR1, anti-MRP1 e anti-MRP2 (1:1000), utilizando como controle positivo a B-tubulina (B-tub, 40 kD). Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $< 0.0001$  comparado com o controle negativo utilizando teste T, teste paramétrico no programa GraphPad Prisma 9.0.

## 5.6 Ensaio citogenético

A análise citogenética foi realizada de acordo com os critérios da ISCN (2020), que determina os critérios de alterações cromossômicas clonais (CCAs). As células A549 apresentam o cariótipo:  $(57\sim 65 < 3n >, XY, -1, -3, -4, del(6)(p22), der(6)t(1;6)(q21;q27), del(11)(q23), -13, +16, +17, -18[20cp])$ , são células próximas a triploíde de forma que cada cromossomo apresenta três cópias. Um cariótipo próximo a triploíde apresenta de 58 a 80 cromossomos. As células A549 apresentaram um

cariótipo próximo a triploide (3n) (“near-triploide”), com número de cromossomos variando entre 57 e 65. O número de cromossomos mais frequente de  $n=65$ . Foram analisadas 20 células, dentre elas foi observado alterações aneuplóides variáveis com ganho ou perda de cromossomos, como por exemplo, perda dos cromossomos 1,3,4,13,18, 21 e 22 e ganho dos cromossomos 16 e 17. Dentre as alterações estruturais, essa linhagem apresentou 3 principais alterações presentes em todas as células: (1) deleção do braço curto do cromossomo 6, (2) derivativo da translocação envolvendo o cromossomo 1 e 6 e (3) deleção do braço longo do cromossomo 11. Essas alterações foram encontradas em todas as metáfases (Figura 16).

Figura 16 – Principais alterações estruturais das células parentais A549

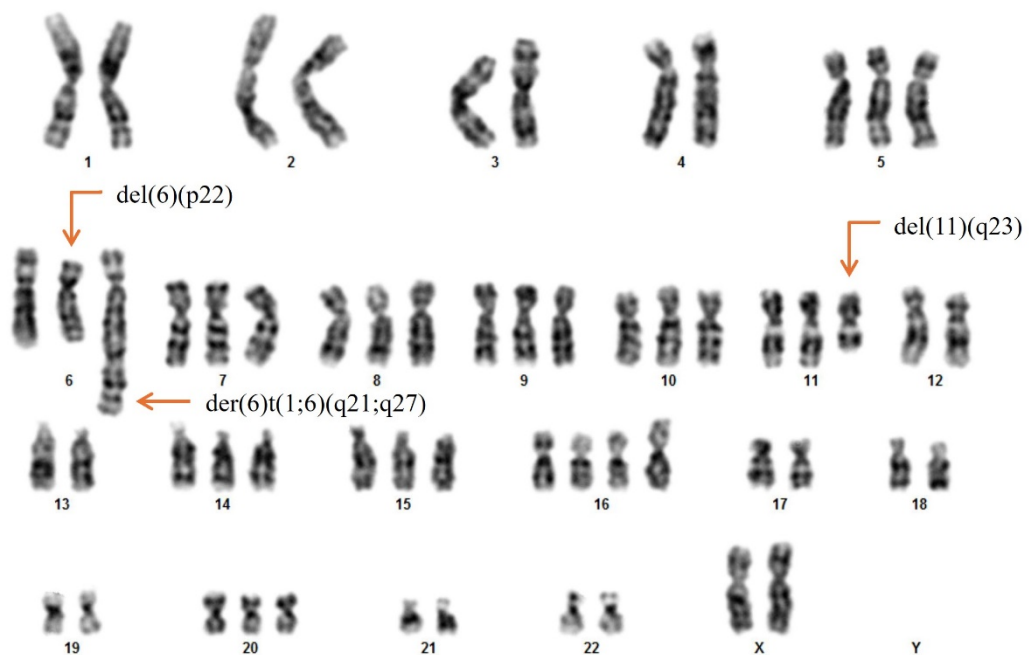


figura 16. Imagem de uma metáfase da célula A549 parental com as três principais alterações estruturais em destaque (setas) e as alterações aneuplóides variáveis (perda ou ganho de cromossomos).

Além disso, foi observado na linhagem resistente A549DDP20 apresentam o cariótipo: (59~62<3n>,XY,-1,del(2)(p10),-3,-4,-5,del(6)(p22),der(6)t(1;6)(q25;q27), 10,del(11)(q23),der(12)t(1;12)(q25;q24.3),-13,-18,add(19)(q13.2),-21,add(21)(p13), 22,del(22)(q12)[20cp]), apresentaram número de cromossomos semelhantes as células parentais variando entre 59 e 62 cromossomos. O número de cromossomos mais frequente de  $n=62$ . Também foram analisadas 20 células, com perda de cromossomos 1,3,4,13,18, 21 e 22,

os mesmos encontrados nas células parentais, além disso o cromossomo 5 também apresentou perda. Em relação as alterações estruturais essas células apresentaram mesmas 3 principais alterações e mais 5 alterações não encontradas na linhagem A549: (1) deleção do braço curto do cromossomo 2, (2) derivativo da translocação envolvendo o cromossomo 1 e 12 e (3) material adicional no braço longo do cromossomo 19, (4) material adicional no cromossomo 21 e (5) deleção do cromossomo 22. A deleção do cromossomo 2 e o derivativo (1;12) foram observadas em todas as metáfases (Figura 17).

Figura 17-Principais alterações estruturais das células parentais A549DDP20



Figura 17. Imagem de uma metáfase da célula A549 resistente com as três principais alterações e mais outras alterações estruturais (setas) adicionais encontradas apenas nessas células. Presença das alterações aneuplóides variáveis (perda ou ganho de cromossomos).

## 6. DISCUSSÃO

A resistência aos agentes quimioterápicos está se tornando um grande impedimento para o tratamento de pacientes com câncer de pulmão (SNLC e NSCLC) levando a ineficácia da quimioterapia (Shen et al., 2014). Em geral, considerou-se que o fenótipo de resistência a drogas ou multidrogas (MDR) está associado, a mecanismos multifatoriais, mas a superexpressão do transportadores de membrana como MDR1, MRP1 e MRP2 estão entre as

causas bem conhecidas de MDR (HALDER et al., 2022), sugerindo que as células tumorais com fenótipo MDR eram mais resistentes aos quimioterápicos do que as células tumorais sem a superexpressão dos transportadores.

Frente a isso, o câncer de pulmão é uma neoplasia agressiva com alta morbidade e mortalidade (Hanke et al., 2018), apresentando a sua alta propensão a metástases em órgãos distantes. Além disso, o NSCLC é o principal (85%) subtipo histológico da doença (Siegel; Miller; Jemal, 2019), após diagnóstico a quimioterapia é um dos principais tratamentos. A cisplatina (DDP) é o agente quimioterápico de primeira linha para o tratamento de NSCLC devido à sua efetiva atividade anticancerígena. O DDP reage com o DNA para induzir seus efeitos biológicos característicos, levando a danos no DNA ou ativação do programa apoptótico irreversível (Siddik, 2003b). No entanto, o efeito antineoplásico do DDP é bastante prejudicado pela resistência aos medicamentos que pode ser devida a alterações na expressão gênica, pois alterações em certos genes reguladores podem levar ao aumento ou diminuição dos níveis de expressão de proteínas importantes na resistência e sobrevivência das células cancerígenas (Galluzzi et al., 2012). Vários mecanismos têm sido propostos na resistência ao DDP, como o aumento da expressão da glicoproteína-p1 ou MDR1 “drug pump” e MRPs (Kanintronkul et al., 2011).

O objetivo do primeiro capítulo foi desenvolver um modelo biológico *in vitro* resistente a cisplatina a partir da linhagem parental A549 para triagem de compostos moduladores de resistência. Em este trabalho, foi induzido a resistência múltiplas drogas utilizando o substrato cisplatina (DDP) a partir de células parentais de câncer de pulmão humano A549, como modelo biológico *in vitro* conhecendo que o fenótipo MDR é multifatorial e pode ser conferido pela extrusão dos quimioterápicos, via transportadores ABC, ou por vários outros mecanismos intrínsecos que afetam a via de indução de morte celular.

Nesse contexto, após uma indução de 9 meses a linhagem celular A549DDP20 resistente o DDP foi desenvolvido com a finalidade de ser utilizada como modelo *in vitro* de triagem para inibidores de MDR. Para poder ser considerado um modelo *in vitro* fidedigno foi realizada a sua caracterização como o monitoramento da indução gradiente e continua realizada nas células A549DDP20 partir das células parentais (A549) mostrando valores de índice de resistência (IR) 16,13 vezes ao DDP, em comparação com as células A549. Vildan e colaboradores (2012), estabeleceram uma linhagem resistente a cisplatina CR-A549 com uma



indução de concentrações crescente (0,1-0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) por um período de 6 meses, onde foi observado um índice de resistência de 6,5 vezes. Além disso, após 24 h de tratamento com cisplatina foi observado um aumento da  $\text{IC}_{50}$  nas células A549/DDP quando comparadas a linhagem A549 (Cetintas et al., 2012; Fang et al., 2017b).

Essa característica multirresistente das células resistentes A549 pode implicar na falha quimioterápica do DDP com outros medicamentos anticancerígenas na prática clínica (Karthika et al., 2022). Para isso, nesse trabalho foi avaliado a resistência cruzada com outros substratos ou quimioterápicos utilizados no tratamento no câncer de pulmão de segunda linha e observou-se que apresentou resistência cruzada com doxorubicina e paclitaxel  $\text{IR} > 2$ . Considerando que ambos quimioterápicos são descritos como substratos de transportadores ABC. Eles, podem efluir em uma ampla gama de medicamentos contra o câncer e sua expressão confere resistência cruzada, denominada "resistência a múltiplas drogas" (MDR) (Lin et al., 2020; Takahashi et al., 2013; Zahreddine; Borden, 2013). Uma linhagem resistente a etoposídeo A549RT-eto exibiu valores de resistência cruzada entre 3,09-27,7 com diferentes quimioterápicos (Yodsoi Kanintronkul, 2011). O gefinitib apresenta um efeito citotóxico em linhagens resistentes (Yang et al., 2005), ao avaliar a citotoxicidade do gefinitib na linhagem A549DDP20 observou-se que não apresenta alteração da  $\text{IC}_{50}$  na linhagem parental e resistente, mostrando valores de  $\text{IR} < 1$ . Esses resultados, indicam a obtenção de um modelo biológico *in vitro* pelo nível de resistência baixo da linhagem resistente comparada a sua linhagem parental (Mcdermott et al., 2014; Tippett et al., 2022).

Para entender os mecanismos de resistência das células do adenocarcinoma pulmonar, e importante comparar a morfologia também entre as linhagens parentais e resistentes (Gao et al., 2019). Uma linhagem A549RT-eto apresentou um aumento no tamanho das células, perda de adesão celular, formato fusiforme após um período de 18 meses de indução (Yodsoi Kanintronkul, 2011). Neste estudo, as células resistentes mostraram mudança na morfologia aumentando de tamanho com forma mais irregular o citoplasma e perderam adesão entre uma célula e outra. Além disso, observou-se uma população heterogênea entre células proliferantes e células gigantes poliploides paralisadas pela proliferação. Também foram relatadas em vários estudos de linhagens celulares resistentes que essas alterações estruturais podem facilitar a sobrevivência de células resistentes à cisplatina após a terapia (Mirzayans; Andrais; Murray, 2018).

Maioritariamente na clínica, as células resistentes crescem mais rapidamente devido a diferentes mecanismos de resistência que podem estar presentes (Gaglia et al., 2021). Em este estudo, a linhagem celular resistente cresceu mais lentamente que a linhagem celular parental e o tempo de duplicação das células A549DDP20 foi maior que o das células A549 ( $31,91 \pm 0,75$  vs.  $19,24 \pm 0,37$  h). Pesquisadores descobriram que o menor crescimento de células resistentes *in vitro* pode ser pela existência de células dormentes não cíclicas ou seja, representam o equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular. A dormência celular denota o estado em que as células sofrem quiescência e é caracterizada por autofagia, sinalização de tolerância ao estresse, sinais microambientais e modificações epigenéticas (Min; Lee, 2023). Quando comparado com nossos resultados que sugerem que após o término da indução de resistência, às células A549DDP20 mudaram suas características de proliferação lentamente com o atraso do pico de divisão (Mirzayans; Andrais; Murray, 2018).

Por outro lado, a família de transportadores cassete de ligação de ATP (ABC) de proteínas transmembrana tem sido associada à resistência a quimioterápicos comumente usados, promovendo o efluxo de drogas e a sua superexpressão de mais de um transportador ABC por uma mesma célula tumoral já havia sido descrita anteriormente como a proteína 1 de resistência a múltiplas drogas (MDR1, ABCB1), proteína 1 associada a MDR (MRP1-ABCC1) e proteína 2 associada a MDR (MRP2-ABCC2) (Li et al., 2009). Investigações mostraram que exposições com cisplatina aumenta a expressão MDR1 e MRP2 concentração dependente em linhagem como A549 e NCI-H446 (Ke et al., 2013b; Xin et al., 2022). Portanto, as linhagens celulares foram caracterizadas utilizando western blot observando, alto nível de expressão de MDR1(5,43) foi detectado na membrana das células A549DDP20, enquanto na linhagem parental A549 como controle a sua expressão de MDR1 foi pouco detectável (0,02). Além disso, apresenta alta expressão das proteínas MRP1 e MRP2 com 6,24 e 4,62 correspondentemente. Por outro lado, na linhagem parental, observou-se uma menor expressão relativa para as proteínas MRP1 (2,31) e MRP2 (2,85). Em conjunto foi detectado a expressão proteica MDR1, MRP1 e MRP2 localizada no citoplasma das células tumorais A549DDP20. Expressão e a localização celular do produto dos genes de resistência que desempenha um papel importante na quimioterapia contra o câncer (Januchowski et al., 2016).

Considerando que a superexpressão de MRP também é um dos principais mecanismos de resistência à cisplatina. Borst e colaboradores sugeriram que MRP1, MRP2, MRP3 e MRP5



também medeiam algum grau de resistência à cisplatina aumentando a exportação de cisplatina fora das células (Li et al., 2009). Por outro lado, o mecanismo de resistência à cisplatina nas células A549DDP20 ainda não está totalmente determinado, portanto, mais investigações são necessárias. No entanto, a resistência é supostamente devida a um mecanismo multifatorial, incluindo padrões alterados de expressão do transportador, reparo de incompatibilidade e modificação de no pico de divisão. Dessa forma, a heterogeneidade resultante com diversas alterações fenóticas também induz mudanças adaptativas que conferem propriedades de quimiorresistência nas células cancerígenas e, portanto, prejudica o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes (Ballestreri et al., 2018).

A heterogeneidade tumoral, por exemplo, a coexistência de subpopulações distintas de células que abrigam também genótipos diferentes, poderia ser a explicação para diferentes comportamentos biológicos de tumores semelhantes. Considerando o câncer como uma doença heterogênea associada a anomalias cromossômicas, o entendimento do comportamento do câncer deve abordar alterações citogenéticas específicas tornando a análise citogenética uma abordagem essencial para identificar os genes envolvidos na patogênese do câncer (Ribeiro; Melo; Carreira, 2019).

Uma compreensão dos mecanismos genéticos subjacentes à sensibilidade e resistência das células tumorais aos agentes quimioterápicos é importante do ponto de vista biológico e clínico. Nesse contexto, evidências anteriores de análise citogenética de linhas celulares estabelecidas em NSCLC revelou um padrão de aberrações cromossômicas recorrentes, ou seja, ganhos de 5p, 7 e perdas de 3p, 9p, 17p, sendo o cromossomo Y mais frequentemente relatado (Lukeis et al., 1990). Além disso, perdas alélicas detectadas por estudos de perda de heterozigose (LOH) em mais de 600 NSCLC identificaram várias regiões de deleção cromossômica consistente, nomeadamente em 2q, 3p, 5q, 8p, 9p, 11p, 13q, 17p, 17q, 18q, e 22q, que potencialmente contêm genes supressores de tumor. Por outro lado, as regiões cromossômicas que foram frequentemente afetadas pelos ganhos de DNA incluíram 1q, 3q, 5p, 8q, 11q, 15q, 19q e 20q (Pei et al., 2001).

Estudos da análise citogenética da linhagem A549 realizado pela técnica CGH descrevem alterações com mais perdas do que ganhos, especificamente a perda de todos ou da maioria dos cromossomos 4, 6 e 13. Os ganhos foram restritos às regiões em 2p, 11p, 15q e

17(Luk et al., 2001). Park e colaboradores (2000) observaram sondas de pintura específicas, usando a técnica de FISH, para os cromossomos 1, 2, 11, 15 e 19, e sondas de pintura específicas para bandas de 6q23, 15q22 e 19q13 na linhagem celular A549. Além disso, A549 teve deleções de 3p com pontos de interrupção na banda 3p13.

Relatos anteriores demonstraram regiões do genoma envolvidos na quimiorresistência em diferentes linhagens celulares. Em alguns desses estudos, houve elevados níveis de amplificação em certos cromossomos. Knutsen et al. (1998) mostraram amplificação do gene MDR1 em 7q21 em uma linhagem celular de câncer de mama resistente ao paclitaxel, e em linhas celulares de carcinoma do cólon resistentes à adriamicina e à actinomicina. Outro estudo mostrou dois locais potenciais como em 4q e 6p com importância para análogos de platina em pacientes com carcinoma de ovário que não respondem a cisplatina (Kudoh et al., 1999).

No presente estudo foi observado na linhagem parental A549 alterações perda de cromossomos e ganho de cromossomos, esses achados foram relatados anteriormente na literatura. Além disso, foi observado alterações estruturais como deleção do braço curto do cromossomo 6, derivativo da translocação envolvendo o cromossomo 1 e 6 e a deleção do braço longo do cromossomo 11 que são também relatadas na literatura. Além disso, a linhagem A549DDP20 resistente, mostrou alterações mais complexas não relatadas anteriormente, destacando a deleção do cromossomo 2p que relatos anteriores evidenciam ganho do braço 2p ou perda em outro braço. Assim, a deleção do cromossomo 2p é uma alteração nova descrita, incluído alteração estrutural do cromossomo 12q. Adicionalmente, a alteração do cromossomo 19 na linhagem A549DDP20 é relatada como uma alteração comum da linhagem A549. Por fim, a deleção do cromossomo 6p está presente nas duas linhagens celulares analisadas e dados relatados na literatura descrevem deleção do cromossomo 6q na linhagem A549 (Park et al., 2001).

Cabe ressaltar que a linhagem A549 é uma linhagem com mais alterações numéricas do que alterações complexas. Apesar disso, foi observado maior complexidade estrutural na linhagem A549DDP20 do que alterações numéricas levando a uma maior dificuldade na avaliação citogenética. Ao analisar os dois perfis citogenéticos de ambas as linhagens foi possível evidenciar as alterações da linhagem A549DDP20 resistente após tratamento com cisplatina. Em conclusão, no nosso estudo foi utilizado a técnica de coloração em bandas G que consegue analisar alterações genéticas de grande escala, em comparação com as técnicas CGH *array* ou FISH, também conhecidas como citogenética molecular. Estas últimas permitem

avaliar alterações menores como microdeleções ou microamplificações tendo como principal limitação o preço. Assim, a citogenética clássica consegue mostrar uma imagem única e global do material genético de uma célula e conseguiu, nesse estudo, mostrar diferenças nítidas entre as duas linhagens estudadas, porém podem ser utilizadas como técnicas complementares (Struski et al., 2001).

Esses achados citogenéticos representam múltiplas lesões genéticas, que podem estar associadas ao desenvolvimento da resistência no câncer de pulmão após o tratamento com cisplatina e, portanto, essas podem ser as possíveis regiões candidatas dos genes relacionados a resistência de múltiplas drogas no câncer de pulmão.

## **7. CONCLUSÃO**

Inicialmente no estudo se desenvolveu o modelo biológico *in vitro* de células de câncer de pulmão resistentes a cisplatina (A549DDP20) para triagem de novas moléculas que moduladoras de resistência, mostrando alterações citogenéticas novas não relatadas anteriormente destacando a deleção do cromossomo 2p que relatos anteriores evidenciam ganho do braço 2p ou perda em outro braço. Assim, a deleção do cromossomo 2p, incluído alteração estrutural do cromossomo 12q.

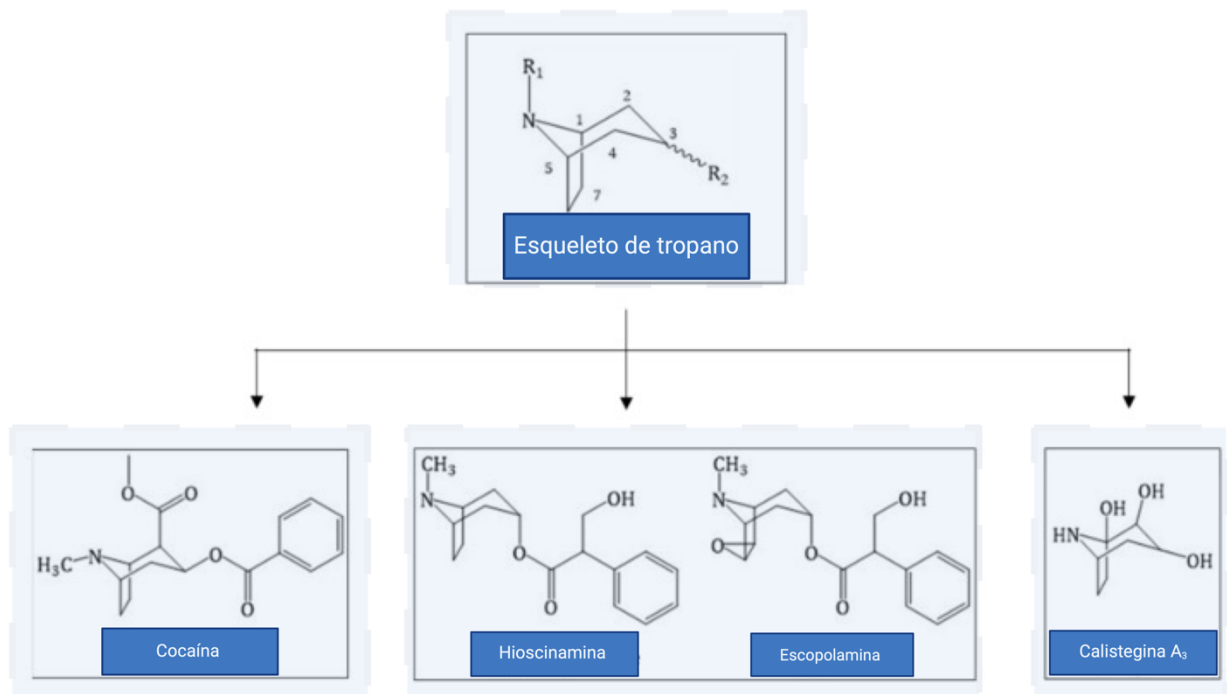
## **8. CAPÍTULO 2**

### **8.1 INTRODUÇÃO**

O gênero *Erythroxylum* apresenta mais de 230 espécies, é o gênero principal e mais representativo da família Erythoxylaceae, difundido nas regiões tropicais da América do Sul, África, Sudeste Asiático e Madagascar, com principais centros de diversidade e endemismo no Brasil e na Venezuela (LOIOLA et al., 2007). Para a flora brasileira, o gênero *Erythroxylum* foi atualizado recentemente, passando de 118 para 128 espécies onde suas principais ocorrências estão na floresta amazônica e na “caatinga”, bioma típico do semiárido do nordeste brasileiro (CORDEIRO; Loiola, 2018).

Os alcaloides tropano (AKTs) são os princípios metabolitos ativos das plantas medicinais mais antigas do mundo (Figura 19), cujas principais aplicações etnofarmacológicas incluem analgesia, alucinógenos e envenenamento. Cocaína, atropina e escopolamina, compostos de aplicações médicas inestimáveis, são os exemplos mais conhecidos de alcaloides tropano (O'connor, 2010). A atropina é um medicamento anticolinérgico utilizado para problemas oftalmológicos e cardíacos, além de antídoto contra intoxicações por agrotóxicos. A escopolamina, que também é um agente anticolinérgico, tem sido utilizada como antiemético, além de apresentar indicações off-label para espasmos gastrointestinais e depressão (Thiessen; Aebisher; Bartusik-Aebisher, 2023)

Figura 18- Estruturas químicas a partir do esqueleto tropano com diferentes atividades biológicas



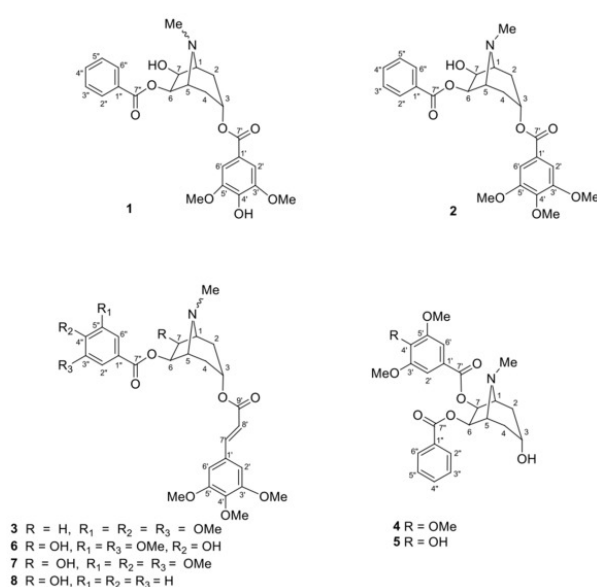
Há muitas décadas a indústria farmacêutica conhece o potencial farmacológico dos alcaloides tropanos (ATKs) que são definidos mais especificamente como todas as moléculas que possuem um sistema de anéis de tropano e nitrogênio na sua estrutura química (Figura 9). Os AKTs podem ser encontrados na família Solanaceae (Kohnen-Johannsen; Kayser, 2019) e em diferentes gêneros como Moraceae, Erythroxylaceae e Brassicaceae (Dräger, 2004). Além disso, podem ser encontrados em diferentes espécies, enquanto ao gênero, por exemplo *Erythroxylum*: *Erythroxylum caatingae* Plowman, *Erythroxylum subrotundum* A. St.- Hil,

*Erythroxylum revolutum* Mart, *Erythroxylum zeylanicum* O.E. Schulze e *Erythroxylum pervillei* entre outros (Bringmann et al., 2000; De oliveira et al., 2011) sendo descritos mais de 200 diferentes ATks.

Os AKTs, diferem imensamente em suas propriedades biológicas, químicas e farmacológicas, por exemplo como agentes farmacológico para o tratamento da náusea, vômito, enjoo, bem como espasmos musculares lisos (Kohnen-Johannsen; Kayser, 2019). Além disso, diferentes estudos mostraram metabolitos secundários com potencial inibidor sobre mecanismos de resistência *in vitro* (MI et al., 2002b). Destaca-se as espécies *Erythroxylum pervillei* Baillon e *Erythroxylum rotundifolium* Lunan realizando um estudo de isolamento como resultando de mais de 12 AKTs mostrando atividade com células de carcinoma epidermóide oral multirresistente (MI et al., 2002a). Assim, ésteres de tropano deste tipo podem reverter o fenótipo de resistência a múltiplas drogas, presumivelmente interagindo com a glicoproteína-P.(Chávez et al., 2002)

No Brasil existe a espécie *Erythroxylum Bezerrae*, é uma planta endêmica da região Nordeste, que não apresenta estudos como moduladores ou inibidores de resistencia a múltiplas drogas, ou seja, é inédita. Seis alcaloides tropanos descritos por Brito e colaboradores (2020), designados como eritrobezerrinas A-F (Figura 19), foram isolados do extrato EtOH da casca do caule de *Erythroxylum bezerrae* Plowman mostraram citotoxicidade dos compostos isolados foi avaliada contra as linhagens celulares de câncer L929, PC-3, HCT-116, SNB-19 e NCI-H460, mas apenas a eritrobezerrina C apresentou atividade moderada com valores de IC<sub>50</sub> de 3,38 e 5,43µM para HCT-116 e NCIH-460, respectivamente.

Figura 19- Estruturas dos alcaloides tropanos (1-8) isolados de *Erythroxylum bezerrae*



Fonte: Brito e colaboradores (2020)

De fato, é necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e levará a melhores resultados para os pacientes. O paradigma atual afirma que, a terapia combinada deve ser a melhor opção de tratamento, pois deve impedir o desenvolvimento de resistência a medicamentos e ser mais eficaz do que qualquer medicamento isoladamente. Nesse contexto a U.S Food and Drug Administration (FDA) oferece orientações para a indústria para avaliação de metabolismo *in vitro* e transportador droga-droga. Ressalta os efeitos relevantes dos transportadores de membrana e seus efeitos na farmacocinética e farmacodinâmica. Por outro lado, um composto ativo pode modular a expressão ou atividade do transportador resultando na disposição da alteração endógena. Diferentes transportadores com relevância clínica podem interagir com compostos por exemplo: MDR1, MRPs, BCRP, OAT1/OAT3. Por isso, a determinação de substratos ou inibidores de transportadores MDR e MRPs podem ser expressos em diferentes tecidos como trato gastrointestinal, fígado, rim, cérebro e pulmão ou que pode afetar a viabilidade dos compostos. Nesse contexto a FDA (FDA, 2017) menciona parâmetros para conduzir estudos *in vitro* ou *in vivo* como:

- Utilização de linhagens celulares que expressem as proteínas de interesse
- Determinação a potência de inibição ( $IC_{50}$  ou  $K_i$ )
- *In vivo*, a administração oral da dose do inibidor  $IC_{50} > 25 \mu L$
- Índice de resistência (IR)

Além disso, atualmente é considerado os estudos *in silico* para obter uma predição de ligação do transportador. Nesse contexto, neste estudo tentou-se avaliar os AKTs baixo alguns parâmetros mencionados anteriormente.

## 9.OBJETIVOS

### 9.1 Objetivo general

Avaliar os efeitos modulador de resistência a múltiplas drogas dos alcaloides tropanos EB-PA e EB-PB da espécie *Erythroxylum Bezerreae* e sua combinação com cisplatina *in vitro* na linhagem A549DDP20.

### 9.2 Objetivos específicos

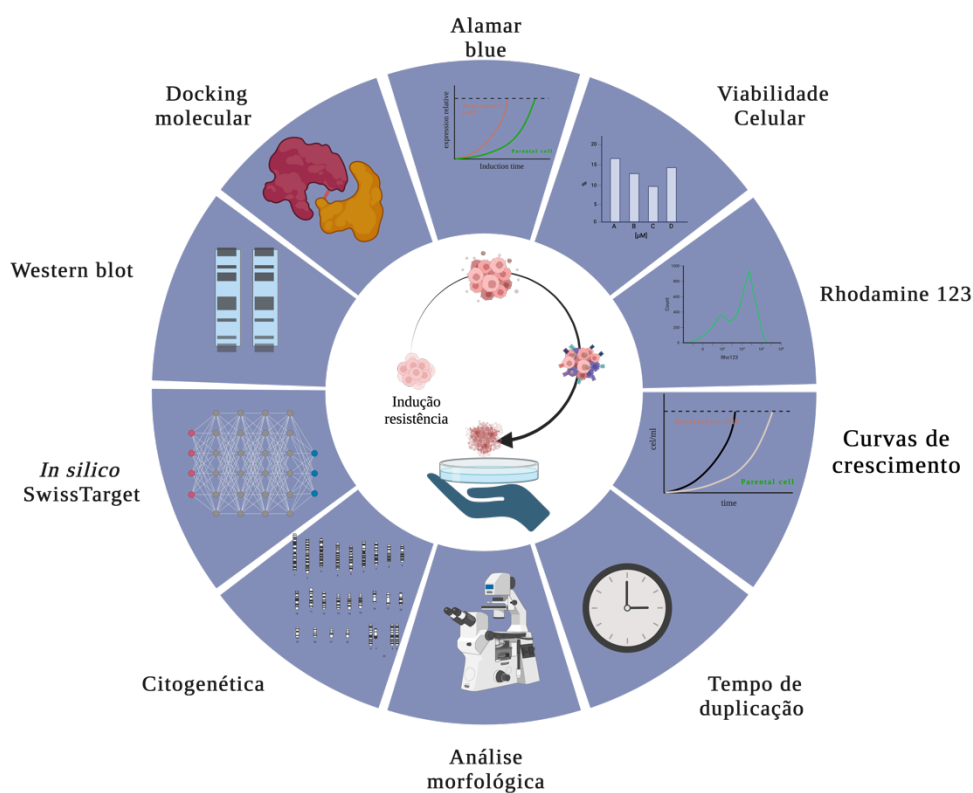
1. Determinar dos efeitos citotóxicos de compostos EB-PA e EB-PB da espécie *Erythroxylum Bezerreae* em linhagens celulares tumorais (A549 e A549DDP20) e não tumorais (MRC-5) *in vitro*.
2. Avaliar teórica de alvos farmacológicos dos compostos EB-PA e EB-PB utilizando o software: Swiss Target Prediction.
3. Avaliar o efeito hemolítico dos compostos EB-PA e EB-PB em eritrócitos em camundongos *Swiss Mus musculus*.
4. Avaliar a atividade moduladora MDR nas células A549 e A549DDP20 após a incubação de 3 e 24 horas com a EB-PA e o EB-PB *in vitro*.
5. Determinar a percentagem de acumulação de rodamina 123 intracelular após incubação de 1:30, 3, 6, 12 e 24 horas com a EB-PA
6. Determinar o modo de interação de EB-PA e cisplatina pelo método de isoblograma de índice de combinação (CI) de Chou-Talalay em células A549 e A549DDP20.
7. Avaliar a densidade celular das células A549 e A549DDP20 após incubação de EB-PA e cisplatina isolados e em diferentes combinações.
8. Avaliar a la sobrevivência celular após os tratamentos isolados e em combinação pelo ensaio clonogenico.
9. Avaliar expressão da proteína Bax, MDR1, MRP1 e MRP2 células após os tratamentos isolados e em combinação nas células A549 e A549DDP20.
10. Investigar a interação molecular com as proteínas MDR1 e MRP1 da EB-PA e o EB-PB.

## 10. MATÉRIAS E MÉTODOS

## Desenho experimental geral capítulo 1 e 2

A figura 20 apresenta o desenho experimental onde está descrito as etapas que foram realizadas deste trabalho de forma geral como as metodologias que foram empregadas.

Figura 20-Desenho experimental



Fonte: própria do Autor (Biorender.com)

### 10.1 Obtenção dos Alcaloides tropanos (AKTs)

Neste estudo, foram avaliados 2 alcaloides tropanos (AKTs), foram isoladas do extrato etanólico da casca do caule de *Erythroxylum Bezerreae* uma planta endêmica da região Nordeste do Brasil, foram cedidos pelo Departamento de Química, da Universidade Federal do Ceará, dirigido pela Profa. Otilia Deusdênia Pessoa Loiola e a discente de doutorado Luana San de Oliveira Brito como atividade de colaboração entre projetos de pesquisa conjuntos (Brito et



al., 2020). As amostras foram dissolvidas em solução salina 0,9% em uma concentração de 5mM e realizados várias alíquotas e guardada no nitrogênio líquido para evitar degradação ou perda de atividade.

## 10.2 Avaliação da atividade citotóxica pelo ensaio Alamar blue *in vitro*

### *Princípio de teste*

O alamar Blue é um reagente de ensaio de viabilidade celular que contém o corante indicador azul permeável, não tóxico e fracamente fluorescente chamado resazurina. Este é um reagente confiável e estabelecido que está disponível desde 1993. É um método rápido, sensível e barato. A resazurina é usada como um indicador de oxidação-redução (REDOX) que sofre alteração colorimétrica em resposta à redução metabólica celular. A forma reduzida, resorufina, é rosa e altamente fluorescente, e a intensidade da fluorescência produzida é proporcional ao número de células vivas que respiram (Rampersad, 2012).

### *Procedimento experimental*

As células A549 foram colhidas por tripsinização e semeadas em  $7,5 \times 10^4$  cél/mL em placas de 96 poços, após 24 horas foram incubadas com DDP, verapamil, EB-PA e EB-PB para determinação da  $IC_{50}$  no tempo de 24, 48 e 72 horas. As células A549DDP20 foram colhidas por tripsinização no final de suplementações com a DDP e esperando 1-2 passagens para seu uso, em seguida, foram semeadas em  $7,5 \times 10^4$  cél/mL em placas de 96 poços e incubadas durante a noite para determinar a resistência relativa. Células A549DDP20 foram incubadas 50-200  $\mu$ M de DDP como concentração maior da curva. Além disso, foi testado a citotoxicidade de EB-PA e EB-PB para obter  $IC_{50}$  e realizar a comparação com a linhagem parental (concentração maior da curva 50  $\mu$ M) após 24,48 e 72 horas. Foi utilizado o verapamil como controle positivo (100 $\mu$ M) em todos os tempos testados. O índice de resistência (IR) foi calculado pela razão do  $IC_{50}$  de linhas celulares resistentes sobre  $IC_{50}$  das linhas celulares parentais. Quimioresistência é definida como  $IR \geq 2$  (Govindan et al., 2015). Após 24,48 e 72 horas de tratamento. Finalmente, o reagente Resazurin 31,2  $\mu$ g/mL (sigma Aldrich-R7017) foi adicionado a cada poço e incubado por 4 horas. A fluorescência foi medida a 560/590 nm no espectrofotômetro (Perkinelmer Víctor nivo TM). A viabilidade celular relativa para cada grupo foi calculada por comparação com a das células de controle utilizando o Prisma 9.0.

### *Análise de dados*

As substâncias foram avaliadas em diluições seriadas, em três experimentos independentes, cada um com duplicatas ou triplicatas. A partir dos valores de absorbância obtidos, as concentrações inibitórias médias ( $CI_{50}$ ) foram calculadas com intervalos de confiança de 95% (IC 95%) por meio de regressão não linear, utilizando o software Prism versão 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

### **10.3 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos em camundongos Swiss *Mus musculus***

#### *Princípio do teste*

A hemólise é comumente utilizada como a avaliação inicial de toxicidade. A atividade hemolítica é um requisito padrão para qualquer composto que tenha contato com o sangue. Este teste é fundamentado na lise dos eritrócitos induzida por fatores como íons metálicos, carga superficial, ou outras causas que levam à ruptura dos eritrócitos (Greco, 2020). Esta metodologia possibilita a avaliação do potencial da substância em teste para causar lesões na membrana plasmática da célula, seja por meio da formação de poros ou pela ruptura total. Utilizam-se hemácias de camundongos devido à grande semelhança com as hemácias humanas, especialmente em relação à sensibilidade (Dresch et al., 2005).

#### *Procedimento experimental*

Os alcaloides tropanos EB-PA e EB-PB foram avaliados quanto ao potencial em causar lesões na membrana plasmática das células, seja pela formação de poros ou pela ruptura total, para isso o sangue foi coletado de camundongos Swiss (*Mus musculus*), previamente anestesiados, por punção cardíaca (n=9). Os eritrócitos foram lavados 3X em solução salina estéril e centrifugados (1500 rpm/5 min), os sobrenadantes foram descartados e a partir do pellet (100%) foi elaborada uma solução de eritrócitos 2% (SE). Posteriormente foi elaborada uma curva de diluição seriada a partir de uma concentração de 170 $\mu$ M de cada composto e incubados com eritrócitos em placa de 96 poços. Após 1 hora de incubação sob agitação constante e temperatura ambiente, após o período de incubação as placas foram centrifugadas (2000 rpm/10

min), a o sobrenadante foi analisado. A leitura ótica foi realizada em leitor automático de placas (450 nm) para determinação da absorbância. Foi analisado o % de hemólise normalizado ao controle negativo (DMSO 10%) e foi utilizado o Triton-100x 1% como controle positivo. Este experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (CEUA – NPDM), com o número de protocolo 41111022-0. O certificado de aprovação encontra-se anexado no Anexo A.

#### **10.4 Citotoxicidade e sinergismo da combinação de cisplatina e EB-PA**

##### *Princípio do teste*

O índice de combinação (IC) e a fração afetada (Fá) foram propostos para avaliar o sinergismo. A equação do CI é baseada na equação de efeitos múltiplos de drogas do método Chou-Talalay que poderia fornecer o índice de combinação (IC) para avaliar quantitativamente as interações de drogas: sinergismo (IC <1), efeito aditivo (IC = 1) e antagonismo (IC > 1) (CHOU, 2010a). Para cada nível de Fa, os valores de IC foram calculados pelo software CompuSyn de acordo com a seguinte equação:

$$IC+(D)_1/(DX)_1+(D)_2/(DX)_2$$

##### *Procedimento experimental*

Nesta equação, D1 e D2 indicam as doses do composto 1 (EB-PA) e do medicamento 2 (DDP) em combinação que leva à inibição do crescimento de Fa × 100% no experimento real, enquanto (DX)1 e (DX)2 são as doses do composto 1 e do composto 2 isoladamente que resultam em Fa × 100% de inibição do crescimento. As células foram semeadas em placas de 96 poços e posteriormente tratadas com a EB-PA e a DDP isoladamente por 72 horas ou em combinação pre-tratadas (24 h) com a EB-PA na presença de DDP. Foram determinados com concentrações fixas de EB-PA (5,4-72µM) e DDP (2,5- 40µM). Resumidamente as células A549 e A549DDP20 (7,5x10<sup>4</sup>cel/mL) foram pre-tratadas por 24 horas com a EB-PA e verapamil (controle positivo), posteriormente as placas foram centrifugadas a 2000 rpm/5 min e retirado o meio com compostos e colocado meio novo com as diferentes concentrações de

DDP durante 48 h, obtendo um tempo final de 72 horas dos grupos em combinação. As concentrações das curvas foram construídas utilizando as proporções Verapamil+DDP (razão não constante 20 $\mu$ M), EB-PA+DDP (10:18) (tabela 5).

Tabela 5-Curva de concentrações utilizadas de EB-PA, DDP e em combinação após 24 horas de pré-tratamento e 48 horas com DDP.

$\mu$ M*		
(D1) EB-PA	(D2) DDP	Combinação
4,50	2,50	7,00
9,00	5,00	14,00
18,00	10,00	28,00
36,00	20,00	56,00
72,00	40,00	112,00

Tabela 5- \* $\mu$ M (micromolar), DDP (cisplatina)

### *Análise de dados*

Os compostos foram avaliados em diluições seriadas, em três experimentos independentes, em duplicatas. A partir dos valores de fluorescência obtidos, foi calculado a fração afetada (Fa) dos compostos isolados e em combinação. Foi determinado o índice de combinação pelo *CompuSym Software*.

## **10.5 Avaliação da densidade e viabilidade celular por citometria de fluxo**

### *Princípio do teste*

Iodeto de propídeo (PI) é um corante fluorescente conhecido por se ligar a ácidos nucleicos (DNA E RNA) das células e citoplasma. É relativamente excluído pelas células vivas, porém penetra rapidamente nas células com membranas danificadas, tornando-as brilhantemente fluorescentes, por sua capacidade de penetrar na célula cuja membrana esteja rompida por ser hidrofílico. A célula com a membrana íntegra emite baixa fluorescência. Deste modo, este método permite avaliar a viabilidade celular através da avaliação de integridade de membrana plasmática das células. O iodeto de propídeo é excitado pelo laser de argônio (488 nm) (RICCARDI; Nicoletti, 2006).

### *Procedimento experimental*

Para determinar o efeito de EB-PA em combinação com DDP na viabilidade e densidade celular foi feito um experimento nas linhagens celulares A549 e A549DDP20, na presença e ausência dos moduladores, verapamil (controle positivo 10 e 20 $\mu$ M) e EB-PA (5, 10 e 37 $\mu$ M) por 24 horas de pré-tratamento e associados ao quimioterápico DDP (20 $\mu$ M) em diferentes combinações durante 48 horas. As células foram incubadas a 37°C por 10 minutos no escuro com solução de PI (50  $\mu$ g/mL). A integridade da membrana celular foi avaliada pela exclusão de PI.

### *Análise de dados*

A fluorescência celular foi determinada por citometria de fluxo em citômetro Guava® EasyCyte™ Mini System (Guava Technologies Inc. Industrial Blvd. Hayward, CA, EUA). Dez mil eventos foram avaliados por experimento e os debris celulares foram omitidos da análise. Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de pos-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa Prism versão 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## **10.6 Ensaio de efluxo Rodamina 123 por citometria de fluxo**

### *Princípio do teste*

A atividade da Pgp-1 das linhagens A549 e A549DDP20 foi medida por ensaio de efluxo com Rodamina-123 (Rho-123). Utilizamos o teste funcional descrito por Altenberg e colaboradores., para medir os fluxos unidirecionais de rodamina 123 (Rho-123, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). A Rho-123 é um substrato fluorescente da Pgp-1 cuja intensidade de fluorescência pode ser mensurada por meio de citometria de fluxo. De tal forma, uma célula que não expressa P-gp1 ou que esteja com a P-gp1 inibida não realiza a extrusão da Rho-123

em uma taxa superior à sua difusão na membrana plasmática, gerando um acúmulo intracelular de Rho-123 e aumento da intensidade de fluorescência (ALTENBERG et al., 1994).

### *Procedimento experimental*

Resumidamente, as células A549/A549DDP20 foram plaqueadas na concentração de  $3 \times 10^4$  e  $9 \times 10^4$  células/mL respectivamente em placa de 24 poços. As células foram incubadas durante 3 e 24 horas com EB-PA e EB-PB candidatos como moduladores Pgp-1, o verapamil 10 e 20  $\mu\text{M}$  foi utilizado como controle positivo inibidor Pgp-1 (MDR1) e DMSO como controle negativo. Posteriormente, foram incubadas por 30 minutos com Rho-123 (5  $\mu\text{M}$ ) a 37°C e com 5%  $\text{CO}_2$  para que ocorresse o acúmulo do substrato na célula. Posteriormente as células foram coletadas, centrifugadas e lavadas com meio IMDM 4°C gelado duas vezes. As células foram resuspedidas em meio IMDM pré-aquecido e deixadas na estufa a 37°C e 5%  $\text{CO}_2$  para que ocorresse a extrusão parcial da Rho-123 durante 1 hora. Posteriormente foi centrifugado e lavado com buffer PBS duas vezes e resuspedidas em volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Foi analisado por citometria de fluxo no GUAVA. Os dados de fluorescência de intensidade mediana (MFI) foram normalizados ao verapamil 10  $\mu\text{M}$  e foi calculado a razão de atividade de fluorescência (FAR) entre linhagem parental e resistente com células tratadas.

### *Análise de dados*

A fluorescência celular foi determinada por citometria de fluxo em citômetro Guava® EasyCyte™ Mini System (Guava Technologies Inc. Industrial Blvd. Hayward, CA, EUA). Dez mil eventos foram avaliados por experimento. Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de pós teste Dunnett's Multiple Comparison. Utilizando o programa Prism versão 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## **10.7 Ensaio da percentagem de acumulação de Rodamina 123 por espectrofluorometria**

### *Princípio do teste*

A atividade da MDR e MRPs foi determinada medindo o acúmulo intracelular de rodamina 123 em células A549 e A549DDP20 na ausência ou presença do controle positivo verapamil 10 e 20  $\mu\text{M}$  utilizando a teoria de Altenberg e colaboradores mencionada anteriormente (Altenberg et al., 1994).

### *Procedimento experimental*

As células foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas a 37 ° C 5%CO<sub>2</sub>, 24 horas depois foram colocada tanto o controle positivo como EB-PA na concentração de 5 e 10 $\mu\text{M}$  nos tempos de 1:30, 3:00, 6:00, 12:00 e 24 horas. Posteriormente as placas foram incubadas com rodamina 123 em uma concentração de 5,00  $\mu\text{M}$  por 30 min. Após 2 lavagens em solução PBS gelado, as células foram lisadas em água destilada e os níveis intracelulares de rodamina 123 foram quantificados por espectrofluorometria usando um espectrofluorímetro (Perkinelmer Víctor nivo TM). (os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 485 e 535 nm, respectivamente). Os dados foram expressos como percentagem (%) de acúmulo de rodamina 123 em células de controle não expostas a inibidores de MDR1, arbitrariamente fixados em 100%.

### *Análise de dados*

As substâncias foram avaliadas em diluições seriadas, em três experimentos independentes, em triplicatas. A partir dos valores de Unidade fluorescência arbitraria obtidos os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de pôs teste Tukey Multiple Comparison. Utilizando o programa Prism versão 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## **10.8 Análise de teste de sobrevivência através do ensaio clonogenico**

### *Princípio do teste*

O ensaio clonogenico é uma ferramenta versátil e frequentemente usada para quantificar a sobrevivência de células cancerígenas *in vitro*. Este processo envolve a capacidade de células cancerosas individuais proliferarem e darem origem a um aglomerado visível de células conhecido como colônia. A proliferação de uma única célula em colônia, que pode ser visualizada no olho nu, é a prova que ela manteve a capacidade de se dividir.

Nesse contexto, a perda da característica reprodutora e a incapacidade de células proliferarem indefinidamente e formarem colônias, podem ser observados no ensaio clonogenico, como consequência torna-se o ensaio confiável para a avaliação da toxicidade *in vitro*, permitindo poder avaliar a sensibilidade das células cancerígenas resistentes aos medicamentos frente aos tratamentos (Brix et al., 2020).

#### *Procedimento experimental*

Inicialmente, as células A549 e A549DDP20 foram plaqueadas 400 células por poço em uma placa de seis poços contendo 3 mL de meio IMDM completo por poço. Após 24 horas de plaqueamento, as células foram incubadas nas seguintes concentrações tanto da Cisplatina (DDP) e EB-PA isoladas, utilizando o Verapamil (Ver 20 $\mu$ M) como controle positivo, EB-PA 10  $\mu$ M e 37  $\mu$ M, DDP 10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M por um tempo de 72 horas de incubação, além disso as células foram incubadas com diferentes combinações: DDP 10 $\mu$ M + Ver 20 $\mu$ M, DDP 20 $\mu$ M + Ver 20 $\mu$ M, DDP 10 $\mu$ M + EB-PA 10 $\mu$ M, DDP 10 $\mu$ M + EB-PA 37 $\mu$ M, DDP 20 $\mu$ M + EB-PA 37 $\mu$ M, sendo uma pré-tratamento de 24 horas com Ver e EB-PA, posteriormente foi retirado o meio e colocado meio novo para fazer a incubação com DDP por 48 horas, obtendo um tempo de 72 horas. Enquanto o controle negativo as células foram expostas a solução salina 0.9%. Posteriormente ao tempo de 72 horas, o meio de cada poço foi trocado por meio novo, e dessa vez, as moléculas não foram adicionadas. A placa foi mantida em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C e permaneceu em observação por 7 dias, período em que as células começaram a se aproximar e o teste foi parado. Para a contagem, as células foram coradas com 0,25% de cristal violeta em 3% de formaldeído, deixou-se 30 minutos sob agitação, em seguida foram feitas 2-3 lavagens com água destilada até obter o total de remoção do excesso do corante, posteriormente as placas foram deixadas a temperatura ambiente para sua secagem total.

#### *Análise dos dados*



O número de colônias foi contado com auxílio de uma lupa estereoscópica, considerando uma colônia a partir de 50 células. Placas triplicadas foram configuradas para precisão. Os dados obtidos foram colocados no programa *GraphPad Prisma 9.0* para verificar a diferença entre os grupos.

### 10.9 Avaliação do racionamento dirigido por bioensaio *in silico*

A ferramenta SwissTargetPrediction, fornece 376342 compostos e 3068 alvos macromoleculares no banco de dados que previram os alvos proteicos mais prováveis de moléculas pequenas para avaliação dos possíveis alvos terapêuticos na espécie *Homo sapiens*. O software: Swiss Target Prediction updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules, Nucl. Acids Res. (2019).

O servidor utiliza os códigos de SMILES de cada molécula. A tabela abaixo mostra os códigos de SMILES empregados para esta análises (Tabela 6).

Tabela 6-Moléculas analisadas no servidor SwissTarget com sua fórmula molecular e SMILES

Composto	SMILES
EB-PA	<chem>(COc1c(OC)cc(cc1OC)C=C/C(=O)OC1CC2N(C(C1)C(C2O)OC(=O)c1cc(OC)c(c(c1)OC)OC)C)</chem>
EB-PB	<chem>COc1cc(\C=C\C(=O)OC2CC3CC(OC(=O)c4cc(OC)c(OC)c(OC)c4)C(C2)N3C)cc(OC)c1</chem>

### 10.10 Simulação de docking molecular

A estrutura química da EB-PA e EB-PB foram desenhadas e os confômeros de menor energia foram salvos em pH fisiológico utilizando o software MarvinSketch (Csizeadnia, 1999) e otimizados utilizando o código Avogadro (Hanwell et al., 2012), configurado para utilizar algoritmo *steepest descente* com ciclos de 50 interações, aplicando o campo de força MMFF94 (*Merck Molecular Force Field*) (Batista de andrade neto et al., 2021; Halgren, 1996).

Para investigar o mecanismo de ação de EB-PA frente à *Human multidrug resistance protein 1* (MRP1) e human P-glycoprotein in the ATP-bound (MDR1), a estrutura do alvo foi obtida no repositório Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), PDB ID: 2CBZ PDB ID: 6C0V respectivamente (Kim; Chen, 2018). Na etapa de preparação do receptor foram removidas as moléculas de água, mantido o ATP e  $Mg^{2+}$ , visto que MRP1 é uma bomba de efluxo dependente de ATP, foram adicionados os hidrogênios polares, cargas Kollman e cargas Gasteiger (Yan et al., 2014) utilizando o software Autodocktools™ (Huey; Morris; Forli, 2012).

As simulações de docking molecular foram realizadas utilizando o software AutodockVina (Trott; Olson, 2010), *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) e *Exhaustiveness 64* (Marinho et al., 2020). O grid de simulação gerado foi centralizado de maneira a envolver toda a estrutura da enzima utilizando os eixos (-12.852 x, 46.180 y, 10.644 z) e *size* (116 x, 116 y, 118 z) para MRP1 e MDR1 O grid de simulação gerado foi centralizado de maneira a envolver toda a estrutura da enzima utilizando os eixos (162.664 x, 172.872 y, 150.508 z) e *size* (72 x, 104 y, 126 z). Também foram realizadas simulações com o controle Verapamil para obtenção de dados comparativos. Foram realizadas 50 simulações independentes, gerando 20 poses por simulação. Para seleção da *best pose* foram utilizados como critérios, o parâmetro estatístico RMSD (*Root Mean Square Deviation*) com valores até 2.0 Å (YUSUF et al., 2008) e a energia de afinidade, considerada ideal quando apresenta valores iguais ou inferiores a -6.0 kcal/mol (Shityakov; Förster, 2014; Silva et al., 2021). utilizada também para avaliar a estabilidade dos complexos formados.

### **10.11 Avaliação da expressão da proteína BAX, MDR1, MRP1 e MRP2 por western blot.**

#### *Princípio do teste*

Os princípios do western blotting são carga igual de proteínas, separação de proteínas por peso molecular, transferência eletroforética para uma membrana adequada e sondagem de anticorpos

Bax, um regulador central da morte celular, é uma porta de entrada indispensável para a disfunção mitocondrial e um importante membro pró-apoptótico das proteínas da família Bcl-2 que controlam a apoptose em células normais e cancerosas. A ativação de Bax induz a

permeabilização da membrana mitocondrial, levando assim à liberação do fator apoptótico citocromo C e, conseqüentemente, à morte das células cancerígenas (Liu et al., 2016).

A proteína Bax foi analisada após as combinações para poder confirmar a existência do processo de morte celular na presença de EB-PA 5, 10 e 37  $\mu\text{M}$  com cisplatina 20 $\mu\text{M}$ . Foi utilizado verapamil como controle positivo em 10 e 20 $\mu\text{M}$ .

#### *Procedimento experimental*

Foi utilizado o mesmo protocolo de western blot detalhado no item 4.5 do **capítulo 1**. Bax (cell signaling 1:1000).

## 11. RESULTADOS

### 11.1 Atividade citotóxica dos alcaloides tropanos (AKTs)

A atividade citotóxica dos alcaloides tropanos (Figura 21) da espécie *Erythroxylum Bezerreae*, planta endêmica da região Nordeste, foi avaliado frente a quatro linhagens de células tumorais (próstata, sistema nervoso, pulmão e câncer colorretal) e uma não tumoral (fibroblasto murinho) pelo ensaio do MTT 72 horas de incubação (Tabela 7). doxorubicina foi utilizado como controle positivo, experimentos realizados por Brito e colaboradores no ano 2020.

Figura 21-Estrutura química dos alcaloides tropanos da espécie *Erythroxylum Bezerreae*.

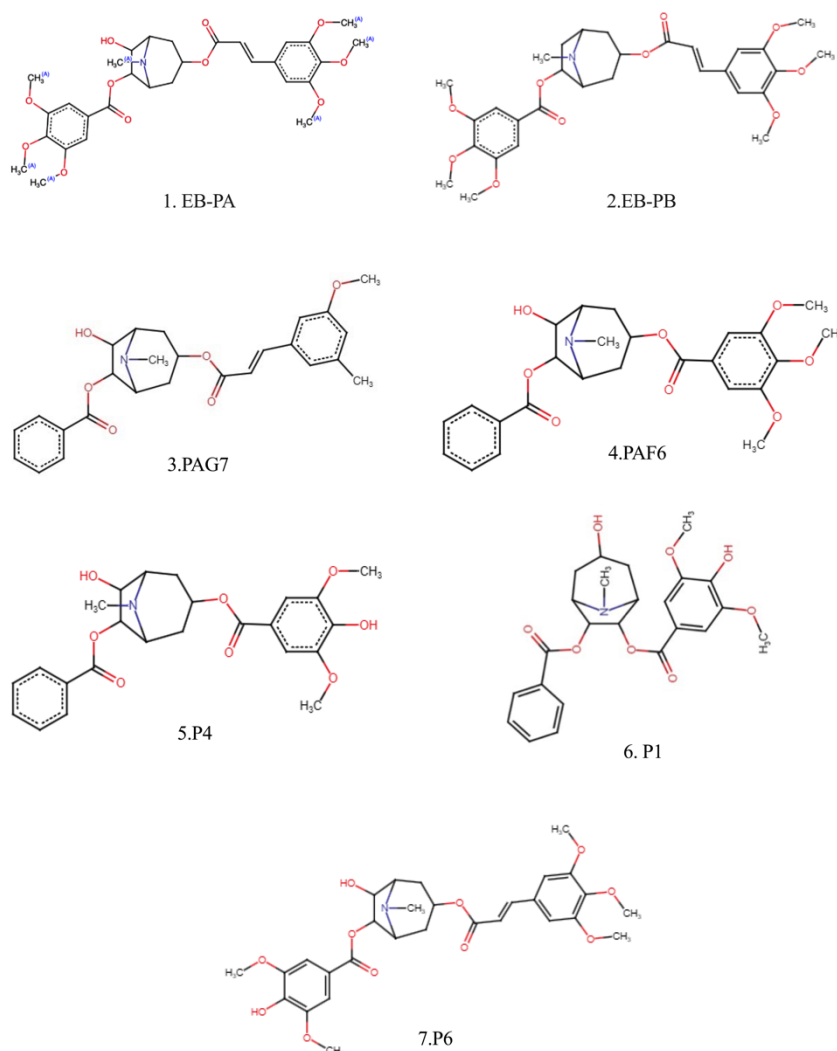


Tabela 7-Avaliação citotóxica dos alcaloides tropanos (AKTs) após 72 horas de incubação

Amostra	IC <sub>50</sub> (INTERVALO) *				
	L929 (Fibroblasto murino)	PC-3 (câncer de próstata)	HCT-116 (câncer colorretal)	SNB -19 (câncer do sistema nervoso)	NCIH-460 (câncer Pulmão)
<b>EBCPA G7</b>	30,58 (25,29 – 30,80)	>40	19,26 (17,75-20,91)	31,37 (25,92-31,99)	17,33 (15,74-19,08)
<b>EBCPA F-6</b>	>40	>40	28,07 (25,58-30,81)	21,23 (17,60-25,63)	21,95 (18,80-25,63)
<b>EBCP4</b>	>40	17,14 (15,11-19,46)	28,95 (26,21-31,97)	36,67 (21,81-61,66)	15,45 (12,60-18,93)
<b>EBCP1</b>	>40	>40	38,88 (36,50-41,42)	>40	>40
<b>P6</b>	>40	>40	17,75 (15,52-20,31)	28,41 (25,38-31,80)	29,81 (26,30-33,79)
<b>EB-PA</b>	19,40 (14,699 – 25,89)	10,56 (9,75- 11,45)	16,45 (14,15 – 17,87)	13,89 (12,65-15,26)	10,55 (9,43-11,80)
<b>EB-PB</b>	20,71 (18,42 – 23,31)	15,02 (13,36 –16,89)	3,38 (3,05 – 4,205)	10,47 (9,64-11,37)	5,43 (4,88-6,04)
<b>DOX</b>	1,72 (1,58-1,87)	0,76 (0,59-0,93)	0,21 (0,16-0,29)	0,15 (0,13-0,18)	2,06 (1,73-2,45)

Tabela 7- Os valores de IC<sub>50</sub> estão apresentados em µM e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software). Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos dois experimentos independentes realizados em duplicata. DOX (Doxorrubicina) controle positivo.

Os resultados mostram que os AKTs apresentam uma citotoxicidade significativa após 72 horas, em diferentes linhagens tumorais como PC-3, HCT-116, NCIH-460 e SNB-19 e uma linhagem não tumoral L929, apresentando concentrações IC<sub>50</sub> entre intervalos de 3,38-40,00 µM. Mostrando concentrações IC<sub>50</sub> frente a linhagem não tumoral L929 entre intervalos de 19,40-40 µM. Na tabela 8 observa-se que o composto EB-PB apresentou melhor citotoxicidade contra as linhagens celulares de câncer HCT-116 (IC<sub>50</sub> 3,38 µM) e NCI-H460 (IC<sub>50</sub> 5,43 µM) (BRITO et al., 2020).

Conseqüentemente neste trabalho, foi calculado o índice de seletividade dos AKTs para determinar se os compostos são mais seletivos ou não a célula normal, ou as células tumorais no qual os valores >2 são considerados significativos. Os resultados mostram que tem uma maior seletividade par a linhagem de HCT-116 e NCIH-460 para o composto EB-PB, e para o

composto EB-PA os índices de seletividade foram menores que 2 nas linhagens testadas (Tabela 8).

Tabela 8-Tabela de índice de seletividade dos alcaloides tropanos após 72 horas de incubação.

Linhagem Celular	IS*							
	EBCPAG7	EBCPAF-6	EBCP4	EBCP1	P6	EB- PA	EB- PB	DOX
<b>PC-3 (Próstata)</b>	0,76	1,00	2,33	1,00	1,00	1,84	1,38	2,26
<b>HCT-116 (colorretal)</b>	2,00	1,43	1,38	1,03	2,25	1,18	6,13	8,19
<b>SNB-19 (sistema nervoso)</b>	0,97	1,88	1,09	1,00	1,41	1,40	1,98	11,45
<b>NCIH-460 (Pulmão)</b>	2,23	1,82	2,59	1,00	1,34	1,84	3,81	0,83

\*IS= IC<sub>50</sub> linhagem não tumora/IC<sub>50</sub> linhagem tumoral

## 11.2 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos de camundongos *Swiss Mus musculus*

A fim de verificar se a atividade citotóxica está relacionada com o dano causado na membrana plasmática das células, os compostos EB-PA e o EB-PB que apresentaram melhor efeito citotóxico frente as linhagens tumorais foram testadas quanto à sua capacidade de induzir lise em eritrócitos de camundongos. Os resultados do ensaio hemolítico da EB-PA e o EB-PB estão representados na Tabela 9. Foram testados em diluição seriada, sendo a maior concentração de 170µM.

Tabela 9- Porcentagem de hemólise dos compostos EB-PA e EB-PB determinada em eritrócitos de camundongos *Mus musculus*

Composto	%Hemólise
Controle negativo	0,00
Controle positivo	100,00
EB-PA	0,46
EB-PB	0,17

Tabela 9. Controle positivo foi utilizado o Triton X-100 1%. Controle negativo foi utilizado o DMSO 10% em solução salina. Os dados estão normalizados com o controle negativo.

Considerando com valor de hemólise <10% como não hemolíticas, enquanto valores > 25% apresentam risco de hemólise(Amin; Dannenfeler, 2006). Frente a isso, de acordo com os dados obtidos os alcaloides tropanos EB-PA e EB-PB não apresentaram ação hemolítica mostrando valores de 0,46% e 0,17% respectivamente na concentração máxima testada de 170 $\mu$ M e em nenhuma das outras concentrações da diluição seriada realizada, mostrando ser >10 vezes superior as IC<sub>50</sub> dos compostos, quando comparados ao Triton 1% utilizado como controle positivo mostrando valores de 100 %. Desta forma, os resultados negativos obtidos neste modelo sugerem que a citotoxicidade dos compostos não está relacionados aos danos da membrana (Figura 22).

Figura 22-Avaliação de hemólises por metodologia *in vitro* nos alcaloides tropanos EB-PA e EB-PB

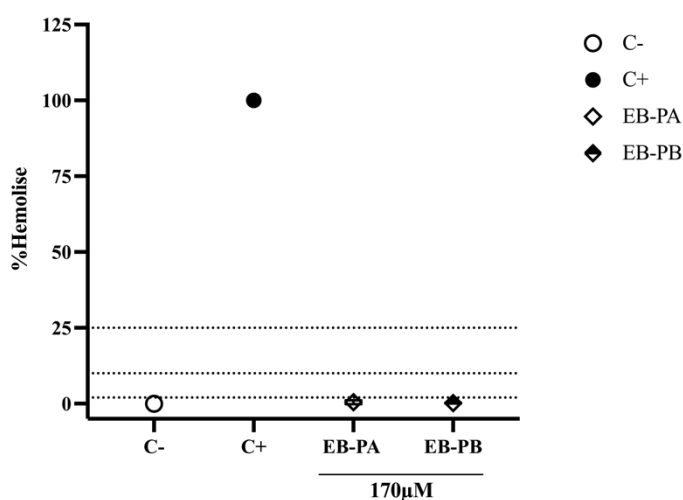


Figura 21- Controle negativo DMSO 10% (C-), Controle positivo Triton 1% (C+), alcaloides tropanos testados na concentração maior de 170 $\mu$ M (EB-PA e EB-PB). Considerando com valor de hemólise <10% como não hemolíticas, enquanto valores > 25% apresentam risco de hemólise. Foi realizado análise de estatística descritiva utilizando o programa Prisma versão 9.0 (GraphPad Software).

### 11.3 Avaliação teórica de alvos farmacológicos

Frente aos resultados iniciais obtidos, foi avaliado de forma teórica os alvos farmacológicos, dos compostos com melhor atividade citotóxica EB-PA e EB-PB (Figura 23) utilizando o software :Swiss Target Prediction update data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules, Nucl. Acids Res. (2019), para avaliação dos possíveis alvos terapêuticos na espécie *Homo sapiens*.

Figura 23-Alcaloides tropanos EB-PA e EB-PB

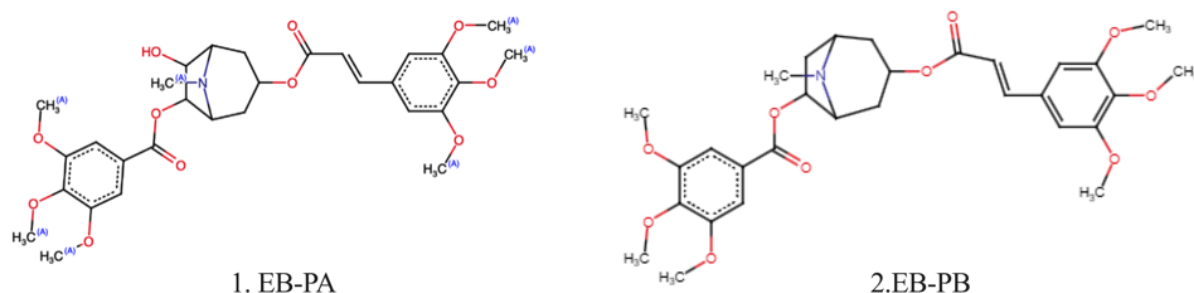


Figura 23. Nomenclatura IUPAC: EB-PA (*6β-(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)-3α-(E)-(3,4,5-trimethoxycinnamoyloxy)-7β-hydroxy-tropane*) e EB-PB (*6β-(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)-3α-(3,4,5-trimethoxycinnamoyloxy)-tropane*).

Nesse contexto, ao avaliar a EB-PA tem probabilidade de interagir com diferentes classes alvo como quinase (40,00%), família A acoplados a proteína G (33,30%) e um 13,30% para transportadores eletroquímicos e transporte ativo primário. Por outro lado, quando comparado com a EB-PB apresentam mais classes alvos como família A acoplados a proteína G (40,00%) e um 46%,00 para alvos com atividade enzimática, (13,30% enzimas Fosfodiesterases 6,7% e oxidorectasas e 6,7% para quinases, enzimas modificadoras 13,3 %). Para transporte ativo um 6,7%. Observando que os compostos diferem estruturalmente no anel de alcaloide na posição 7, o que provavelmente modifica sua interação com as classes alvos (figura 25).

Figura 24-Predição de classe alvo dos AKts EB-PA e EB-PB

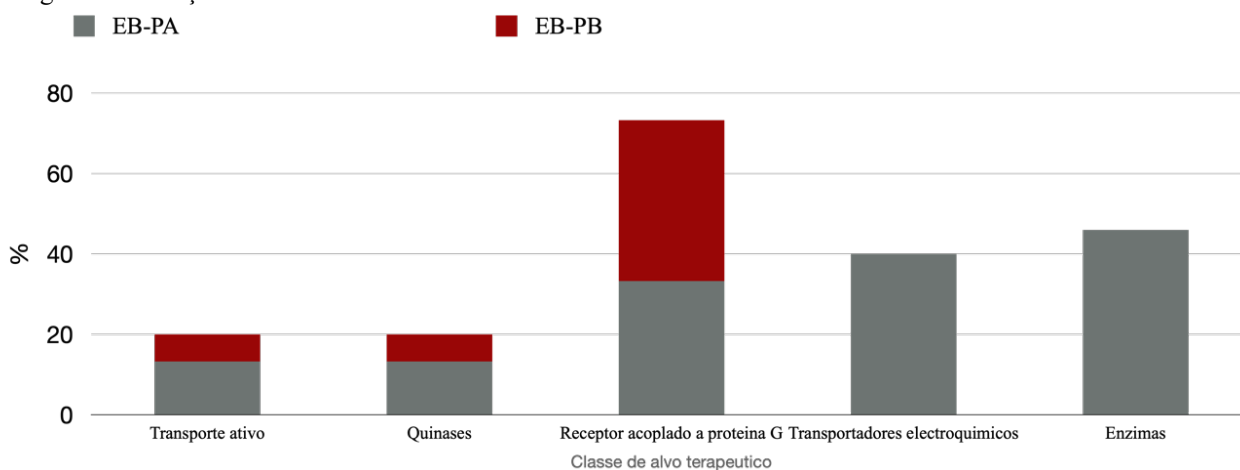


Figura 23-A) Predição de alvo terapêutico de EB-PA SMILES (COc1c(OC)cc(cc1OC)/C=C/C(=O)OC1CC2N(C(C1)C(C2O)OC(=O)c1cc(OC)c(c(c1)OC)OC)C). B) Predição



de alvo terapêutico de EB-PB SMILES  
COc1cc(\C=C\C(=O)OC2CC3CC(OC(=O)c4cc(OC)c(OC)c(OC)c4)C(C2)N3C)cc(OC)c1.

Nesse sentido, um das classes alvos importantes na predição foi o transporte ativo o qual é importante para o funcionamento da resistência a múltiplas drogas (MDR), observando na predição que a probabilidade maior como alvo terapêutico e a Glicoproteína-p1 (ABCB1/MDR1), com valores 0,43 com depósitos de 67 estruturas 9 apresentam ligação com em MDR1 depositadas em ChEMBL para EB-PA, observando o mesmo comportamento para o EB-PB com uma menor probabilidade de ligação ao MDR1 de 0,27 mostrando semelhança com 25 estruturas de 60 depositadas no ChEMBL. Além disso, ambos compostos apresentam probabilidades mais baixas (0,07-0,08) para outros alvos terapêuticos (Tabela 10-11).

Tabela 10-Predição alvos terapêuticos do AKTs EB-PA

Alvo	Nome comum	Classe-alvo	Probabilidade *	Ativos conhecidos (3D/2D)
<b>Glicoproteína P-1</b>	ABCB1	Transportador ativo	0,4336	9 / 67
<b>Óxido nítrico sintase, induzível (por homologia)</b>	NOS2	Enzima	0.0822215 17	3 / 0
<b>EZH2/SUZ12/EED/RBBP7/RBBP4</b>	EZH2	enzimas modificadoras	0.0822215 17	1 / 0
<b>Receptor adrenérgico beta</b>	ADRB2	Receptor acoplado à proteína G da família A	0.0822215 17	56 / 0

Tabela 10- Dados obtidos do Swiss Target Prediction updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules, Nucl. Acids Res. (2019).

Tabela 11-Predição alvos terapêuticos do AKTs EB-PB

Alvo	Nome comum	Classe-alvo	Probabilidade *	Ativos conhecidos (3D/2D)
<b>Glicoproteína P-1</b>	ABCB1	Transportador ativo	0.270412 527	25 / 60
<b>Receptor alfa-2a adrenérgico</b>	ADRA2 A	Receptor acoplado à proteína G da família A	0.074392 272	23 / 0
<b>Receptor de serotonina 2a (5-HT2a) (por homologia)</b>	HTR2A		0.074392 272	32 / 0
<b>Receptor adrenérgico alfa-1d</b>	ADRA1 D		0.074392 272	19 / 0

Tabela 11-Dados obtidos do Swiss Target Prediction updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules, Nucl. Acids Res. (2019).

Como foi observado anteriormente EB-PA e EB-PB mostraram ter efeito citotóxico em diferentes linhagens celulares (Brito et al., 2020). Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar frente aos resultados obtidos da avaliação *in silico* sua atividade como quimiossensibilizadores no modelo biológico A549DDP20 *in vitro*, o qual apresenta superexpressão de MDR e MRP para verificar o possível alvo terapêutico dos compostos que apresentaram melhor atividade citotóxica no estudo de Brito e colaboradores, assim como, a probabilidade de inibição do MDR neste modelo de resistência *in vitro*. O modelo A549DDP20 foi escolhido como a linhagem celular para avaliar a sensibilização das células e não atividade citotóxica dos alcaloides tropanos.

#### 10.4 Avaliação da citotoxicidade celular de EB-PA e EB-PB

A citotoxicidade celular da EB-PA e o EB-PB foi avaliada utilizando a metodologia de alamar blue nas linhagens A549 parental, A549DDP20 resistente e MRC-5 não tumoral, após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Inicialmente, EB-PA e EB-PB foram testados nas linhagens celulares e foi observado que EB-PA não apresentou efeito citotóxico após 24 horas de tratamento. Por outro lado, EB-PB apresentou uma  $IC_{50}$  de 43,43  $\mu$ M na linhagem MRC-5 (fibroblasto de pulmão não tumoral), porém não apresentou efeito citotóxico nas linhagens celulares A549 e A549DDP20. Além disso, o Verapamil foi utilizado como controle positivo e a Cisplatina (DDP) e não apresenta efeito citotóxico após 24 horas de incubação (Tabela 12).

Tabela 12-Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu$ M) dos substratos e compostos candidatos como moduladores ou inibidores de resistência *in vitro* após 24 h de tratamento em linhagens não tumoral, parental e resistentes.

Amostra	IC <sub>50</sub> $\mu$ M			IR
	MRC-5 Fibroblasto de pulmão Não tumoral	A549 Carcinoma de pulmão Parental	A549DDPP20 Carcinoma de pulmão Resistente	
DDP	>50	>50	>200	n. d
VER	>100	>100	>100	n. d
EB-PA	>50	>50	>50	n. d
EB-PB	43,43 (34,87- 69,03)	>50	>50	n. d

Tabela 12-IR= Índice de resistência ( $IC_{50}$  linhagem resistente /  $IC_{50}$  linhagem parental), DDP (Cisplatina), VER (Verapamil), CI 95% (Intervalo de confiança), n.d = não determinado

Posteriormente, o DDP apresentou efeito citotóxico na linhagem não tumoral MRC-5 com uma  $IC_{50}$  de 8,77  $\mu$ M, sem apresentar citotoxicidade nas linhagens A549 e A549DDP20. Além disso, o controle positivo verapamil não apresentou efeitos citotóxicos ao igual que a EB-PA. Por outro lado EB-PB, apresentou efeito citotóxico 11,10 e 21,95  $\mu$ M nas linhagens não tumoral MRC-5 e resistente A549DDP20 respectivamente. No entanto, na linhagem A549 parental não apresentou efeito citotóxico após 48 horas de tratamento (Tabela 13).

Tabela 13-Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu$ M) dos substratos e compostos candidatos como moduladores ou inibidores de resistência *in vitro* após 48h de tratamento em linhagens não tumoral, parental e resistentes.

Amostra	$IC_{50}$ $\mu$ M			IR
	MRC-5 Fibroblasto de pulmão Não tumoral	A549 Carcinoma de pulmão Parental	A549DDPP20 Carcinoma de pulmão Resistente	
<b>DDP</b>	8,77 (7,72 -9,93)	20,95 (11,88- 35,77)	>200	<b>n. d</b>
<b>VER</b>	>100	>100	>100	<b>n. d</b>
<b>EB-PA</b>	>50	>50	>50	<b>n. d</b>
<b>EB-PB</b>	11,10 (8,681 -13,88)	>50	21,95 (16,43 - 28,35)	<b>n. d</b>

Tabela 13-IR= Índice de resistência ( $IC_{50}$  linhagem resistente /  $IC_{50}$  linhagem parental), DDP (Cisplatina), VER (Verapamil), CI 95% (Intervalo de confiança), n.d = não determinado

Ao avaliar a citotoxicidade no tempo de 72 horas, o DDP apresentou efeito citotóxico com  $IC_{50}$  de 8,32, 10,62 e 171,30  $\mu$ M nas linhagens MRC-5, A549 e A549DDP20 respectivamente, exibindo um índice de resistência de 16,13. Por outro lado, o verapamil não apresentou efeito citotóxico em nenhuma das linhagens celulares testadas. Além disso, EB-PA apresentou citotoxicidade apresentando valores de  $IC_{50}$  de 28,10, 17,65 e 15,16  $\mu$ M nas linhagens MRC-5, A549 e A549DDP20 respectivamente, exibindo um índice de resistência de 0,89. Além disso, EB-PA mostrou um comportamento concentração dependente do tempo (Tabela 14).

Tabela 14-Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu$ M) dos substratos e compostos candidatos como moduladores ou inibidores de resistência *in vitro* após 72 h de tratamento em linhagens não tumoral, parental e resistentes.

Amostra	IC <sub>50</sub> μM			IR
	MRC-5 Fibroblasto de pulmão Não tumoral	A549 Carcinoma de pulmão Parental	A549DDPP20 Carcinoma de pulmão Resistente	
<b>DDP</b>	8,32 (7,03-9,85)	10,62 (9,53- 11,84)	171,3 (137,9 -212,7)	16,13
<b>VER</b>	>100	>100	>100	<b>n. d</b>
<b>EB-PA</b>	28,10 (23,35-33,80)	17,65 (15,32 -20,33)	15,66 (13,73-17,85)	0,89
<b>EB-PB</b>	12,42 (10,13-15,23)	31,98 (29,48 -34,70)	17,55 (15,06-20,46)	0,55

Tabela 14-IR= Índice de resistência (IC<sub>50</sub> linhagem resistente / IC<sub>50</sub> linhagem parental), DDP (Cisplatina), VER (Verapamil), CI 95% (Intervalo de confiança), n.d = não determinado

No entanto, o EB-PB observou-se ter efeito mais seletivo frente a linhagem resistente exibindo IC<sub>50</sub> de 17,55 μM e para a linhagem A549 foi de 31,98μM, mostrando ter efeito concentração dependente um comportamento tempo dependente. Ademais observou-se que o índice de resistência foi de 0,55. Além disso, mostrou ter efeito citotóxico nas linhagens MRC-5 com uma IC<sub>50</sub> de 12,42 observando um comportamento concentração e tempo dependente. Além disso, o Verapamil foi utilizado como controle positivo quimiosensibilizante *in vitro* e não apresenta efeito citotóxico nenhum dos tempos testados (Tabela 14).

Nesse contexto, o Índice de resistência (IR) foi calculado para o DDP, EB-PA e EB-PB (AKTs), para avaliar o comportamento de cada composto nas linhagens A549 e A549DDP20. Nesse contexto, quando os compostos com IR < 1 matam as células MDR de forma mais eficaz do que as células parentais e, quando exibem um IR ≤ 0,50, têm um efeito colateral de sensibilidade. Por outro lado, um IR ≥ 2,0 expressa um composto que tem resistência a um fármaco e simultaneamente resistência cruzada (Ramallete et al., 2018). Em base nisso, o DDP apresentou um IR de 16,13 observando resistência ao tratamento após 72 horas (Tabela 14).

Por outro lado, os compostos EB-PA e EP-PB mostraram valores de IR < 1 de 0,89 e 0,55 respectivamente, após 72 horas de tratamento, mostrando sensibilização celular com níveis próximos aos das células parentais originais. Frente a isso, posteriormente foi avaliado o seu possível potencial de modulação de MDR1 na linhagem A549 e A549DDP20 para compreensão do seu mecanismo em concentrações não tóxicas (Tabela 14).

Conseqüentemente, foi avaliado  $IC_{50}$  de todas as amostras testadas na linhagem de fibroblasto de pulmão não tumoral (MRC-5) para determinar o comportamento dos possíveis inibidores e do substrato Cisplatina (DDP), enquanto a sua seletividade nas 3 linhagens de pulmão testadas, no qual os valores  $>2$  são considerados significativos. Na tabela 15 os resultados observados foram que o substrato DDP é mais seletivo para a linhagem não tumoral de fibroblasto de pulmão quando comparada a linhagem A549 parental (0,78). Por outro lado, observou-se um efeito mais seletivo para a linhagem não tumoral também quando comparado a linhagem A549DDP20 resistente (0,05), mostrando uma hipótese que provavelmente quando acontecer efluxo seja mais tóxico para células normais.

Além disso, foi calculado o índice de seletividade dos AKTs observou-se que EB-PA apresenta uma seletividade melhor na linhagem resistente A549DDDP20 de 1,9 e para a linhagem A549 1,5 do que para a linhagem não tumoral. Por outro lado, EB-PB apresentou ser mais seletivo para a linhagem não tumoral do que para a linhagem A549 (IS 0,39) quando comparado a linhagem não tumoral e a linhagem resistente observou-se o mesmo comportamento anterior (IS 0,71) mostrando ser mais citotóxico do que EB-PA no tempo de incubação de 72 horas. No tempo de 48 horas EB-PB mostrou o mesmo comportamento de seletividade para a linhagem não tumoral (IS 0,51) Dados apresentados na tabela 15.

Tabela 15-Tabela de índice de seletividade das amostras avaliados frente a linhagem não tumoral de fibroblasto de pulmão (MRC-5) após 48 e 72 horas de incubação.

Amostra	*IS 48 h		*IS 72 h	
	A549	A549DDP20	A549	A549DDP20
DDP	0,50	n. d	0,78	0,05
VER	n. d	n. d	n. d	n. d
EB-PA	n. d	n. d	1,60	1,90
EB-PB	n. d	0,51	0,39	0,71

Tabela 15- $*IS = IC_{50}$  linhagem não tumoral/ $IC_{50}$  linhagem tumoral, DDP (Cisplatina), VER (Verapamil), CI 95% (Intervalo de confiança), n.d = não determinado

Frente a isso, observou-se que a EB-PA apresenta menos efeito citotóxico quando comparado ao EB-PB após 72 horas de tratamento. Com finalidade de conhecer o possível alvo dos AKTs em concentrações não tóxicas serão testadas em tempos de incubação menor (3 e 24h) tempos de referência do controle positivo (verapamil).

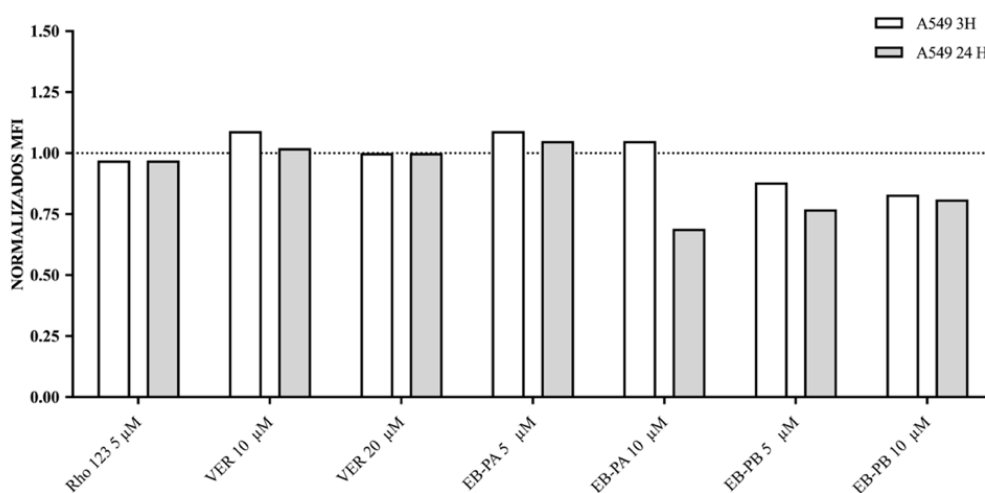
### 11.5 Ensaio de extrusão de rodamina 123 (Rho-123)

Este teste, baseado nos trabalhos de Neyfakh (1988) foi utilizado para verificar a atividade funcional da MDR e MRPs (Neyfakh; Dmitrevskaya; Serpinskaya, 1988), para avaliar o potencial inibitório sobre as bombas de efluxo MDR e MRP da EB-PA e o EB-PB, foi utilizado o ensaio de efluxo Rodamina 123 (Rho123) por citometria de fluxo. Nesse contexto, foi realizada para evitar uma escolha arbitrária de limiar para positividade. Foram analisadas as linhagens A549 (MDR e MRP menor expressão) e A549DDP20 (MDR e MRP maior expressão), posteriormente foram calculadas concentrações não tóxicas de 5 e 10  $\mu\text{M}$  dos compostos candidatos em diferentes tempos de incubação (3 e 24 h). Além disso, foi utilizado o verapamil como controle positivo em concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  permitindo realizar o teste sem efeito citotóxico significativo nas células, de acordo com os dados publicados para o verapamil (inibidor MDR1 de primeira geração)(Rogan et al., 1984).

No gráfico 1, observa-se na linhagem A549DDP20 o efluxo de Rho123 de 0,48 mostrando uma diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle positivo verapamil 10 e 20  $\mu\text{M}$  nos tempos de 3 e 24 h. Da mesma forma, a EB-PA não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle positivo. Por outro lado, o EB-PB apresentou diferença estatisticamente significativa exibindo valores 0,13 e 0,15 nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  no tempo de 3 h. Da mesma forma, no tempo de 24 horas 0,20 e 0,18 nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  com tudo isso EB-PB observou-se um efluxo de Rho-123 nos tempos e concentrações testadas.

Gráfico 1-Gráficos de MFI normalizados ao verapamil nas linhagens A549 e A549DDP20 após 3 e 24 horas de incubação.

A)



B)

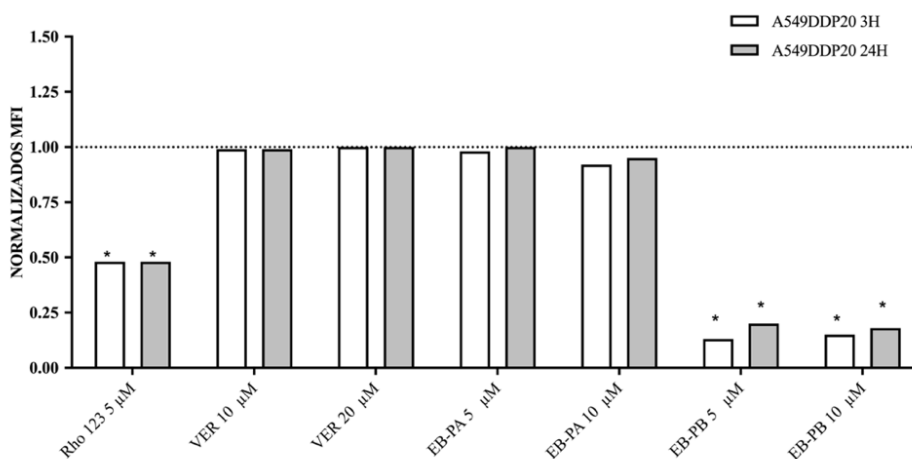


Gráfico 1- Gráficos de MFI normalizados ao verapamil 20µM nas linhagens A549 (parental) e A549DDP20(resistente) após 3 e 24 horas de incubação. MFI (Intensidade Mediana de fluorescência), VER (verapamil) utilizado como controle positivo. Dados analisados no Prisma 9.0 one way anova e pôs teste Dunnett's Multiple Comparison. \*diferença estatística significativa (<math><0.01</math>).

Além disso, observou-se que a EB-PA 5 e 10 µM após incubação de 3 horas mostrou uma possível inibição do efluxo de Rho-123 quando comparado ao controle positivo de 0,98 e 0,92 respectivamente sem apresentar diferença estatística significativa quando comparada ao controle positivo, exibindo um comportamento concentração não dependente. Além disso, no tempo de 24 horas observou-se que a EB-PA 5 e 10 µM apresentaram o mesmo comportamento mostrando valores normalizados de 1,0 e 0,95 respectivamente, concentração não dependente.

Por outro lado, EB-PB na concentração de 5 µM apresentou diferença significativa no tempo de 3 e 24 horas, mostrando diminuição da retenção do substrato Rho-123 de 0,13 e 0,20 respectivamente quando comparado ao verapamil. Além disso, observou-se o mesmo comportamento na concentração de 10 µM nos tempos avaliados, mostrando que provavelmente não tem efeito sobre a inibição MDR ou MRP.

### 11.6 Avaliação da densidade celular por citometria de fluxo

Foi avaliado a densidade celular comparado ao controle negativo tratado com veículo DMSO, para conferir as concentrações não tóxicas utilizadas. Nesse contexto, os grupos

tratados com Rho-123 5 $\mu$ M, Verapamil (10 e 20  $\mu$ M) e EB-PA (5 e 10  $\mu$ M) nos tempos de 3 e 24 horas nas linhagens A549 e A549DDP20 não apresentaram diferença significativa ao controle negativo, conferindo dessa forma a probabilidade da sua modulação MDR e MRP. Além disso, EB-PB 5 $\mu$ M não apresentou diminuição da densidade celular. No entanto, o grupo tratado com EB-PB mostrou diminuição da densidade celular na concentração de 10  $\mu$ M mostrando diferença significativa nas linhagens testadas nos tempos de incubação de 3 e 24 h. O que pode indicar que a diminuição da densidade celular é proporcional a quantidade de efluxo da Rho-123. Dados estão representados no gráfico 2.

Gráfico 2-Gráficos de densidade celular nas linhagens A549 e A549DDP20 após 3h e 24h de incubação

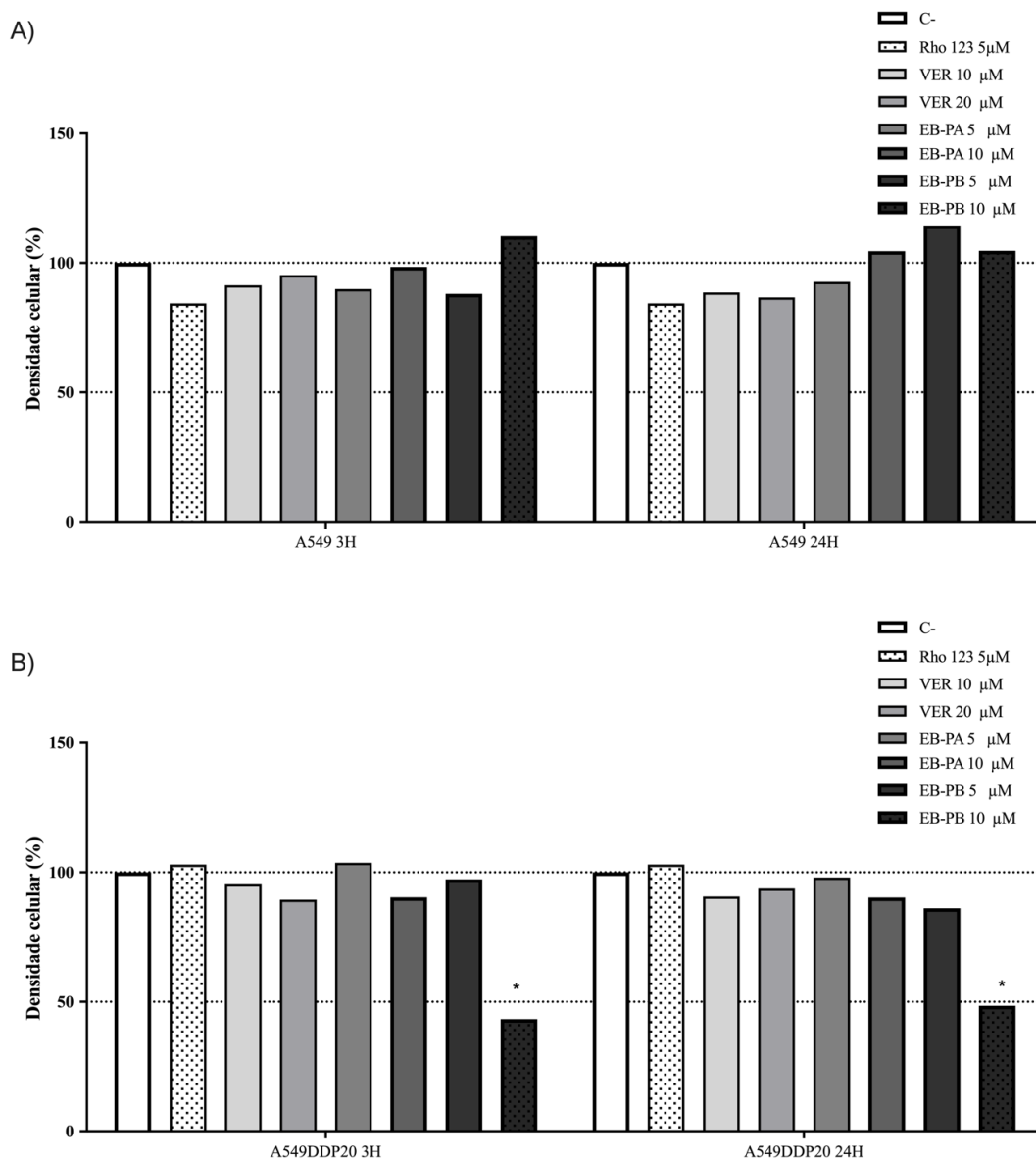




Gráfico 2- Gráfico de densidade celular (%) em células A549(A) e A549DDP20 (B) após 3h e 24 de incubação com o veículo DMSO como controle negativo (C-), Rodamina 123 (Rho123) e tratamento com verapamil 10 e 20 $\mu$ M (controle positivo) e alcaloides tropanos EB-PA e EP-PB (5 e 10  $\mu$ M) após 3 e 24 horas de incubação. (b) Viabilidade celular. Todos os dados são mostrados como média  $\pm$  s.d. de 3 experimentos individuais e normalizados para o verapamil. Estatística foi realizada o teste one-way ANOVA seguido do pós teste Tukey.

Além disso, as atividades de EB-PA e EB-PB podem ser correlacionadas com seus valores de iLogP calculados de acordo com o software on-line: Diana, A. et al. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules(DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Ao analisar a correlação do efeito inibitório MDR/MRP e os valores de iLogP observou-se uma regressão linear entre os valores da EB-PA (iLogP 4,63), EB-PB (iLogP 4,89) e o verapamil (iLogP 4,5) ( $R^2=0.8909$ ), exibindo os valores de iLogP para a melhor inibição em torno de 4-5. Foi utilizado o melhor ajuste de tendência linear para todos os compostos (EB-PA, EB-PB e verapamil), utilizando regressão polinomial com ordem 2 ( $R^2=1$ ) (Gráfico 3).

Gráfico 3-Gráfico de iLogP dos alcaloides tropanos e verapamil frente aos dados normalizados MFI no tempo de 24 h na linhagem A549DDP20

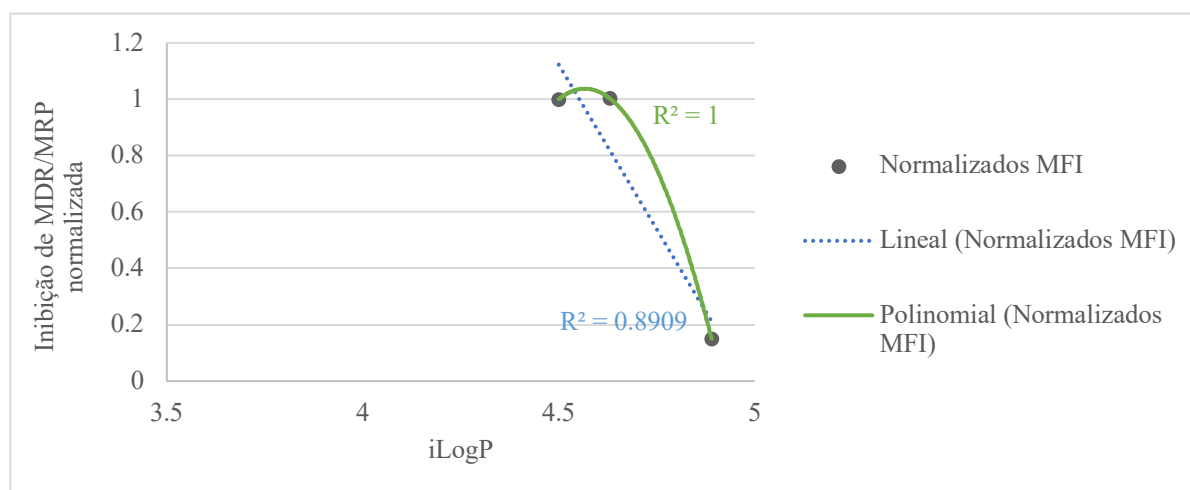


Gráfico 3- A inibição de MDR/MRP para compostos AKTs no ensaio de efluxo de Rodamina 123 foi correlacionada com os valores de iLogP. Ajuste de regressão linear para AKTs (linha azul) e ajuste de regressão polinomial para todos os compostos (ordem 2, linha verde). Os valores de  $R^2$  são indicados em linhas de tendência em cores complementares.

Esta maior eficiência sugere que, para inibir a MDR ou MRP de forma eficaz, a EB-PA apresenta possivelmente uma lipofilicidade ótima para entrar na membrana celular e uma plasticidade conformacional adicional para entrar aos locais de ligação da MDR e MRP, quando comparado ao controle positivo.

Além disso, a razão da atividade de fluorescência (FAR) foi calculada utilizando a equação 2, para os tempos de pré-incubação de 3 e 24 horas da EB-PA e o EB-PB foram avaliados de acordo com os critérios de classificação descritos como, o FAR<1 o efeito baixo, o FAR>1,1 apresenta efeito médio e FAR>5 o efeito e alto (KARS et al., 2006). Observou-se que no tempo de 24 horas EB-PA apresentou o FAR de 1,45 e 1,37 nas concentrações de 5 e 10 µM respectivamente, mostrando um efeito médio. Por outro lado, no tempo de 3 horas na concentração maior testada também apresentou efeito médio, porém na concentração de 5µM o FAR<1 mostrando um efeito baixo, com isso os efeitos de EB-PA são concentração dependente (Tabela 16).

$$\text{FAR} = (\text{MDRtratado}/\text{MDRcontrol}) / (\text{Parentaltratado}/\text{Parentalcontrol}). \quad [\text{Equação 2}]$$

Tabela 16-Tabela de razão da atividade de fluorescência (FAR) na linhagem A549DDP20 nos tempos de 3 e 24 horas de incubação.

Linhagem celular	AMOSTRA	FAR	
		3 H	24 H
A549DDP20	VER 10 µM	0,92	0,98
	VER 20 µM	1,00	1,00
	EB-PA 5 µM	0,90	1,45
	EB-PA 10 µM	1,11	1,37
	EB-PB 5 µM	0,15	0,20
	EB-PB 10 µM	0,19	0,18

Tabela 16- FAR= razão da atividade de fluorescência. FAR= (MDRtratado/MDRcontrol) / (Parentaltratado/Parentalcontrol).

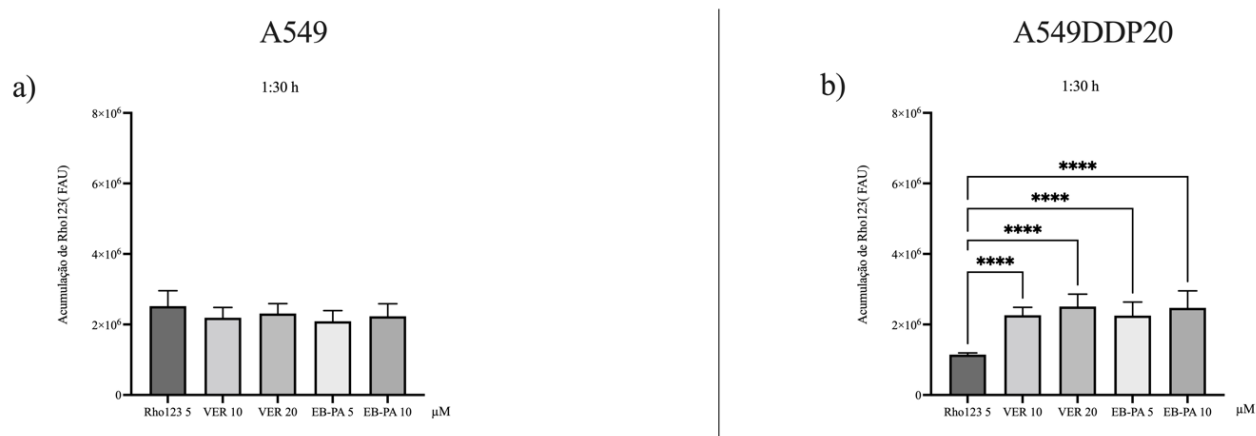
Ao avaliar os dados do FAR do EB-PB no tempo de 3 e 24 horas observou-se um FAR de 0,15 e 0,20 respectivamente, mostrando um efeito baixo na concentração de 5 µM e na concentração de 10 µM. além disso, os valores de 0,19 e 0,18 nos de 3 e 24 h respectivamente mostrando valores de FAR<1 como efeito não significativo quando comparado ao controle positivo.

## 11.7 Percentagem de acumulação de Rodamina 123 (Rho-123) nas células A549 e A549DDP20

Foi realizado uma curva de tempo de 1:30, 3, 6, 12 e 24 horas, e conforme ao observando na figura 25b (1:30h), as células A549DDP20 apresentam maior acumulação de Rho-123 quando comparadas as células parenterais A549, mostrando assim o efluxo mediado pelas proteínas MDR ou MRP do corante fluorescente das células resistentes. Por outro lado, na presença do controle positivo o verapamil nas concentrações de 10 e 20 $\mu$ M, o acúmulo de Rho123 foi restaurado ao nível encontrado nas células parenterais A549 (Figura 25 a). Além disso, o mesmo comportamento e observado em todos os tempos de 6, 12 e 24 horas, tanto nas células A549 e A549DDP20. No tempo de 3 horas observou-se a maior acumulação de Rho-123 concentração dependente do verapamil (Figura 25 c-j).

Nesse contexto, ao avaliar o comportamento temporal da EB-PA nas concentrações de 5 e 10 $\mu$ M observou-se um comportamento similar ao do controle positivo aumentado acumulação de Rho-123 na linhagem A549DDP20 sendo restaurada a acumulação de Rho-123 presente nas células A549 em todos os tempos testadas. No entanto, conforme observado na figura 25d no tempo de 3 horas apresentou maior atividade de acumulação do corante fluorescente concentração não dependente entre as concentrações testadas.

Figura 25-Acumulação de Rodamina 123 (Rho-123) nas células A549 e A549DDDP avaliado nos tempos de 1:30, 3, 6, 12 e 24 horas de pré-incubação



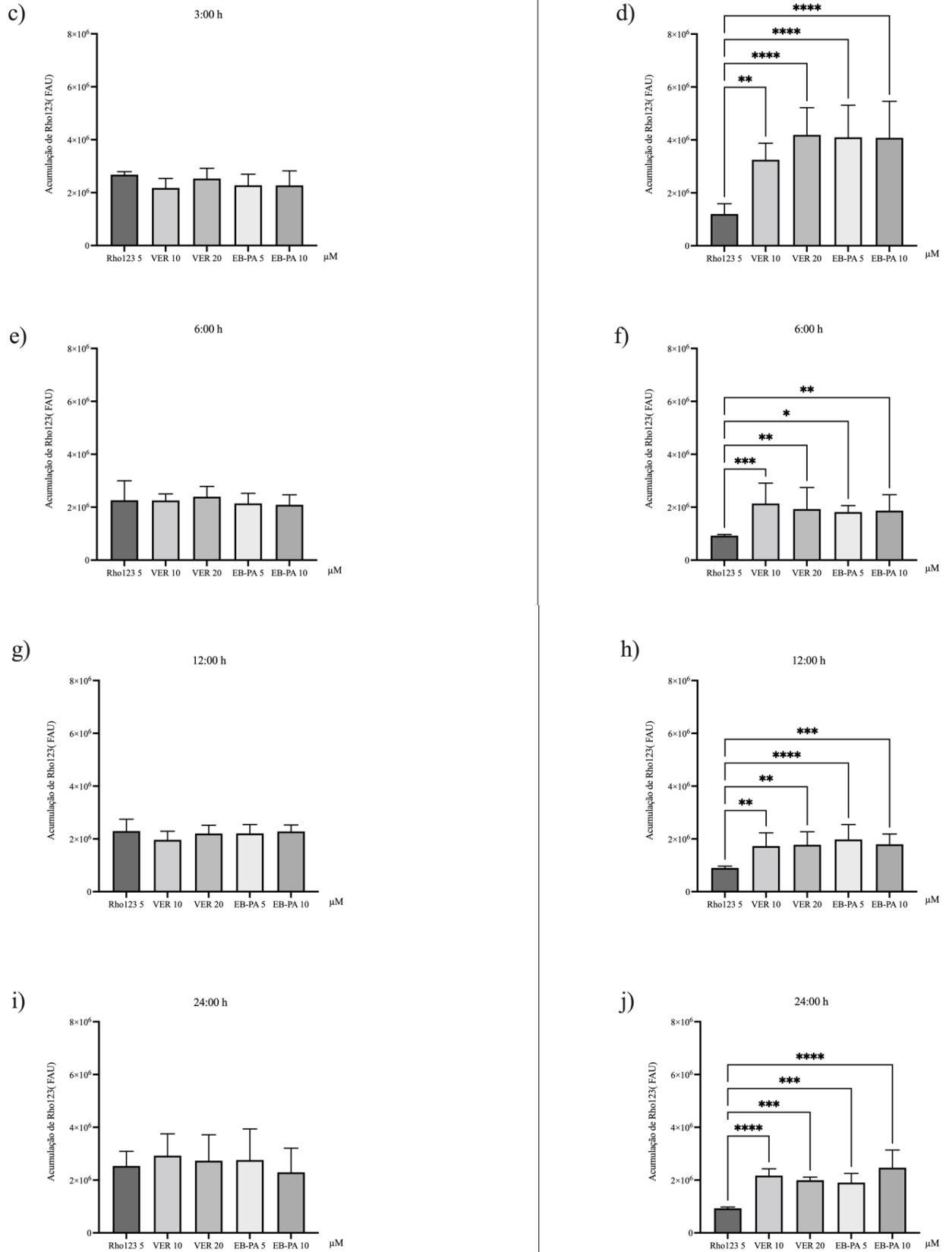


Figura 25-Acumulação de Rodamina 123 (Rho-123) nas células A549 e A549DDDP avaliado nos tempos de 1:30, 3, 6, 12 e 24 horas de pré-incubação. As células foram incubadas com 5 $\mu$ M de Rodamina 123 por 30 mins a 37  $^{\circ}$ C na ausência ou presença de verapamil (10 e 20 $\mu$ M) e a EB-PA (5 e 10 $\mu$ M), após lavagem, o acúmulo de Rho-123

quantificado por espectrofluorimetria. Os dados são expressos como unidade arbitrária de fluorescência (FAU) e são as médias  $\pm$  SEM de 2 experimentos independentes. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,001$ , \*\*\*,  $p < 0,0001$ .

Além disso, os dados foram representados em gráficos como percentual (%) de acumulação de Rho-123 separadamente de cada concentração tanto do controle positivo como do tratamento com EB-PA mostrando o comportamento temporal nos tempos testados mencionado anteriormente na linhagem controle A549DDP20. Conforme a figura 26 a-b, observou-se que o verapamil na concentração de  $10\mu\text{M}$  e  $20\mu\text{M}$  começa a aumentar o % de Rodamina 123 partir de 1:30 hora mostrando seu maior % de acumulação no tempo de 3 horas, com uma diminuição a partir do tempo de 6 horas sem apresentar diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 6, 12 e 24 horas quando comparado a tempo de 3 horas. Além disso, é possível observar comportamento concentração dependente do verapamil (Figura 26).

Figura 26- Porcentagem de acumulação de Rodamina 123 (Rho123) nas células A549DDDP avaliado nos tempos de 1:30, 3, 6, 12 e 24 horas de pré-incubação.

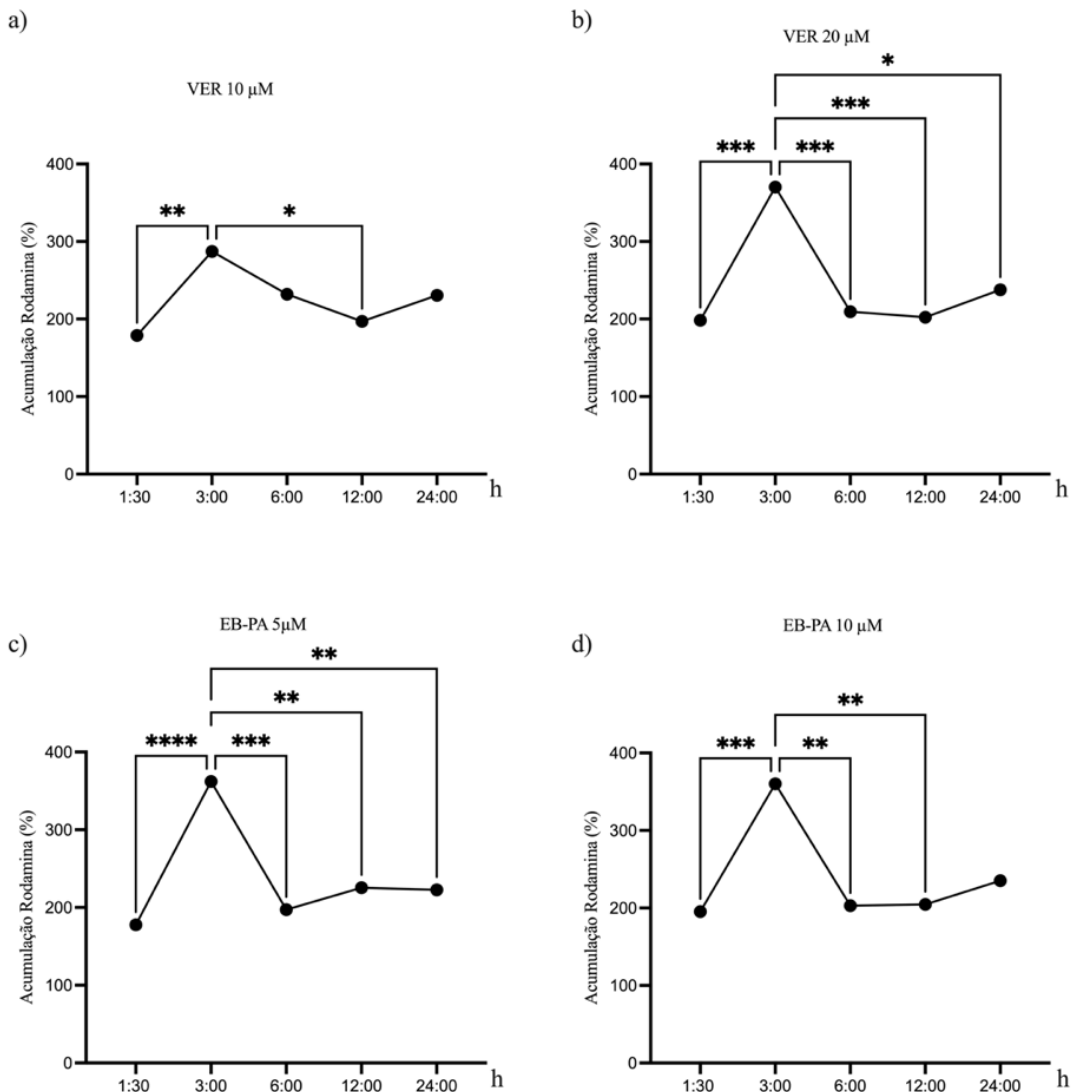


Figura 26- Porcentagem de acumulação de Rodamina 123 (Rho-123) nas células A549DDDP avaliado nos tempos de 1:30, 3, 6, 12 e 24 horas de pré-incubação. as células foram incubadas com 5 $\mu$ M de Rodamina 123 por 30 min a 37 °C na ausência ou presença do verapamil (10 e 20 $\mu$ M) e a EB-PA (5 e 10 $\mu$ M). Após a lavagem, o acúmulo de Rho-123 celular foi quantificado por espectrofluorimetria. Os dados são expressos como % de acúmulo de corante fluorescente em células A549DDP20 de controle expostas apenas a rodamina 123, arbitrariamente fixadas em 100%, e são as médias  $\pm$  SEM de 2 ensaios independentes. \*, p < 0,05, \*\*, \*\*p < 0,001, \*\*\*p < 0,0001 quando comparado às células controle.

Nesse contexto, o tratamento com EB-PA apresenta também seu maior % de acumulação no tempo de 3 horas quando comparadas aos outros tempos testadas, mostrando diferença estatisticamente significativa quando comparado ao tempo de 3 horas, no entanto ao observar os tempos de 6, 12 e 24 horas o % de acumulação de rodamina vai diminuindo sem apresentar diferença estatisticamente significativa entre os últimos tempos testados. Mostrando entre a concentração da EB-PA de 5 $\mu$ M e 10  $\mu$ M.

Tomando em conjunto todos os testes realizados com a Rho-123, esses dados demonstraram que o uso do ensaio de Rho-123 foi adequado para observar especificamente a atividade MDR e sua possível inibição pelo inibidor de referência (Verapamil). Ressalta-se o tratamento com o composto da EB-PA nas células A549DDP20 resistentes tanto no teste de Status funcional MDR e % de acumulação de Rho-123, quando comparado ao composto EB-PB que não apresentou efeitos significativos.

Frente aos resultados promissores obtidos anteriormente, foi escolhida a EB-PA para realizar os testes posteriores. Inicialmente foram realizados testes de índice de combinação utilizando um pré-tratamento com a EB-PA para avaliar o possível efeito de sinergismo com a cisplatina nas células A549 e A549DDP20 após 24 horas, tempo apresento melhor FAR para EB-PA.

### **11.8 Avaliação do efeito sinérgico de EB-PA em combinação com cisplatina na linhagem A549 e A549DDP20 *in vitro***

A atividade citotóxica da EB-PA e cisplatina (DDP) foi determinada primeiro utilizando o ensaio de alamar blue descrito anteriormente tanto a EB-PA e o DDP apresentaram atividade citotóxica na linhagem A549 e A549DDP20 no tempo de 72 horas. A partir de desses

paramentos foi construída as curvas para avaliar o potencial de sinergismo de EB-PA e DDP (Tabela 5) contra a proliferação celular de A549 e A549DDP20, com um pré-tratamento do controle positivo em uma razão não constante (verapamil) e EB-PA com uma razão constante de 10:18 em 24 horas tempo que se observou melhor FAR (efeito médio) enquanto a modulação MDR e MRP. Foi investigado o efeito combinatório usando o método de isoblograma de índice de combinação (CI) de Chou-Talalay (Chou, 2010b).

Inicialmente observou-se na figura 27a e b, tanto para verapamil como para EB-PA respectivamente, apresentam um efeito de antagonismo com  $CI > 1$  para EB-PA com valores de entre 1,07818-1,43596 na linhagem A549. Foi observado um aumento da  $IC_{50}$  do DDP na linhagem A549 quando esta na presença de verapamil e EB-PA mostrando valores de 57,31 e 108,72  $\mu\text{M}$  respectivamente, quando comparado isoladamente o DDP tem  $IC_{50}$  de 24,27  $\mu\text{M}$  após 48 horas de tratamento (Tabela 17).

Figura 27-Representações gráficas obtidas do Relatório CompuSyn para combinações de DDP e EB-PA

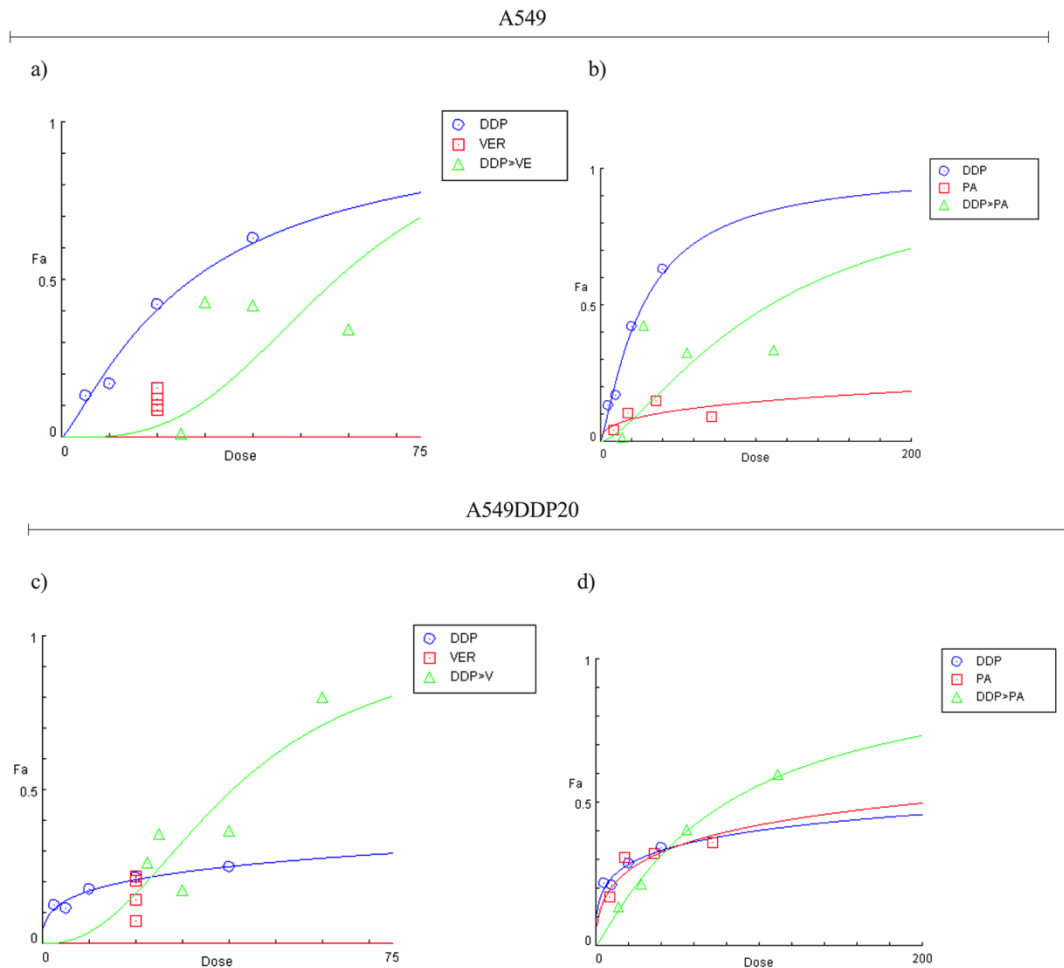


Figura 27- a e b) Curvas dose-efeito em A549. c e d) Curvas dose-efeito em A549DDP20. O índice de combinação (CI) foi determinado usando análise de isoblograma em  $IC_{50}$ . Fa= Fração afetada, dose =concentração. DDP (Cisplatina), VER (Verapamil) e PA (EB-PA). Os dados são a média  $\pm$  DP de dois experimentos independentes, gráficos gerados no CompuSyn.

Por outro lado, na linhagem A549DDP20 a curva de dose efeito do DDP é deslocada para a esquerda mostrando maior efeito na presença de EB-PA (figura 27d). Ao observar valores de CI revelaram interação sinérgica entre EB-PA e DDP com valores de CI (0.04015-7.27E-4) ou seja, valores  $CI < 1$  concentrações entre  $ED_{50}$ - $ED_{90}$ . Nesse contexto, observou-se uma redução da  $IC_{50}$  de DDP passando de 274,9  $\mu$ M para uma combinação de 58,16 na proporção de 10:18. Além disso, ao observar o controle positivo na linhagem A549DDP20 observe-se que ao trabalhar na razão não constante (20:20) por não ter efeito citotóxico o verapamil não apresenta CI não aplica (NA) porém ao observar a figura 27c observamos um deslocamento para esquerda da combinação do DDP e o verapamil mostrando um aumento do efeito citotóxico.

Tabela 17-índice de Combinação de Cisplatinas (DDP) com o verapamil e EB-PA contra o crescimento de células A549 e A549DDP20 *in vitro*.

Linhagem celular	Índice de combinação (CI)		
	$ED_{50}$	$ED_{75}$	$ED_{90}$
<b>A549</b>			
VER+DDP	NA	NA	NA
EB-PA+DDP	1,43596	1,24225	1,07818
<b>A549DDP20</b>			
VER+DDP	NA	NA	NA
EB-PA+DDP	0,04015	0,00526	7,2710 <sup>-4</sup>

Tabela 17-. índice de Combinação de Cisplatinas (DDP) com o verapamil e EB-PA contra o crescimento de células A549/A549DDP20. NA (Não aplica).

Nossos dados sugerem que o verapamil e a EB-PA sensibilizaram as células A549DDP20, mostrando duas possíveis combinações sinérgicas ligeiras com redução de dose favorável. Além disso, foi recalculado novamente o índice de resistência (IR) das combinações na linhagem A549DDP20 observando que o DDP apresenta 11,36 vezes resistência após 48 horas de tratamento, mas na presença do verapamil e a EB-PA o IR foi reduzido para 0,69 e



0,53 respectivamente. Em outras palavras, teve uma reversão de 16,46 e 21,43 do verapamil e a EB-PA respectivamente (Tabela 18).

Tabela 18-Avaliação de reversão múltipla após pré-incubação com Verapamil e EB-PA em combinação com DDP

Combinação	IC <sub>50</sub> μM	IR	Reversão múltipla
	<b>A549</b>	<b>A549DDP20</b>	
<b>DDP</b>	24,27	274,9	11,36
<b>DDP+VER</b>	57,31	39,64	0,69 16,46
<b>DDP+EB-PA</b>	108,72	58,16	0,53 21,43

Tabela 18-IR=Índice de resistência, Reversão múltipla= IR substrato (DDP)/IR Combinação, DDP (cisplatina), VER (verapamil).

Nesse contexto, como foi observado na tabela 18, na combinação de IC<sub>50</sub> para a linhagem A549DDP20 com um pré-tratamento de 24 horas com verapamil a somatória e de 39,64 ou que indica no reporte obtido no CompuSym indica que para obter uma ED<sub>50</sub> foi 19,82 e 19,82 de DDP e verapamil, respectivamente. Além disso, para a EB-PA a predição sugere que a somatória da combinação e de 58,17 μM com tempos de 24 horas de pré-tratamento mostrando uma parte de 20,77 para a DDP e para a EB-PA de 37,39 μM.

Nesse contexto, decidiu-se testar as concentrações para a DDP 20μM, o verapamil de 20μM e a EB-PA de 37,00 μM, utilizando pré-tratamento de 24 h e posteriormente mais 48 horas com a DDP tentando uma redução tanto da concentração de DDP na linhagem A549DDP20 e do tempo de tratamento. Além disso, foram avaliadas outras concentrações em combinações para ter outros parâmetros de comparação além da predição gerada pelo CompuSym.

### **11.9 Avaliação da viabilidade e densidade celular nas linhagens A549 e A549DDP20 em combinações com cisplatina, verapamil e a EB-PA após 24 horas de pré-tratamento e pós tratamento da cisplatina (48 h)**

Para determinar o efeito dos reversores da MDR1 e da MRP1-2 na viabilidade celular foi feito um experimento com as linhagens A549 e A549DDP20, na presença e ausência dos dois reversores, verapamil e a EB-PA, associados ao quimioterápico DDP. O reversor verapamil na concentração de 10 e 20  $\mu\text{M}$  foi utilizado como controle positivo. A viabilidade foi determinada após 72h de cultura.

Ao realizar a predição para obter a melhor concentração do possível reversor MDR e MRPs, avaliou-se 7 combinações tanto do controle positivo (verapamil) e o composto EB-PA no melhor tempo de 24 horas de pré-tratamento das células, por citometria de fluxo utilizando o corante iodeto de propídeo para avaliar a viabilidade e densidade celular. Desta forma, compostos isolados nos tempos de 24 horas, 48 horas para DDP e em combinação um tempo final de 72 horas.

Observou-se na linhagem parental A549 que a DDP na concentração de 10 e 20  $\mu\text{M}$  teve uma diminuição da viabilidade celular apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo. Ao observar o controle positivo (10 e 20  $\mu\text{M}$ ) observou-se que não apresentou diminuição da viabilidade celular, apresentando o mesmo comportamento a EB-PA nas concentrações de 5, 10 e 37  $\mu\text{M}$  após incubação de 24 horas. Nas combinações com o controle positivo mais DDP observou-se uma diminuição da viabilidade celular (DDP 10  $\mu\text{M}$ + Ver 10  $\mu\text{M}$ , DDP 10  $\mu\text{M}$ + Ver 20  $\mu\text{M}$  e DDP 20  $\mu\text{M}$ + Ver 20  $\mu\text{M}$ ) de forma que, na combinação DDP 20  $\mu\text{M}$ + Ver 20  $\mu\text{M}$  observou-se maior diminuição da viabilidade celular (Figura 28)

Por outro lado, quando pré-incubadas as células com a EB-PA 5  $\mu\text{M}$  e posteriormente DDP 10  $\mu\text{M}$  não apresentou diferença estatisticamente significativa. Além disso, observou-se que nas combinações DDP 10  $\mu\text{M}$ + EB-PA 10  $\mu\text{M}$  e DDP 20  $\mu\text{M}$ + EB-PA 37  $\mu\text{M}$  mostraram uma diminuição da viabilidade celular, porém o efeito foi mais evidente na predição realizada DDP 20  $\mu\text{M}$ + Ver 37  $\mu\text{M}$  (Figura 28a, b).

Deve se ressaltar que o efeito de antagonismos previsto na predição na linhagem parental não foi observado de uma forma pronunciada já que decidiu-se padronizar as concentrações para a linhagem resistente.

Figura 28-Avaliação da viabilidade celular na linhagem A549 e A549DDP20 de 24 horas de pré- incubação e 48 horas pós incubação com cisplatina *in vitro*

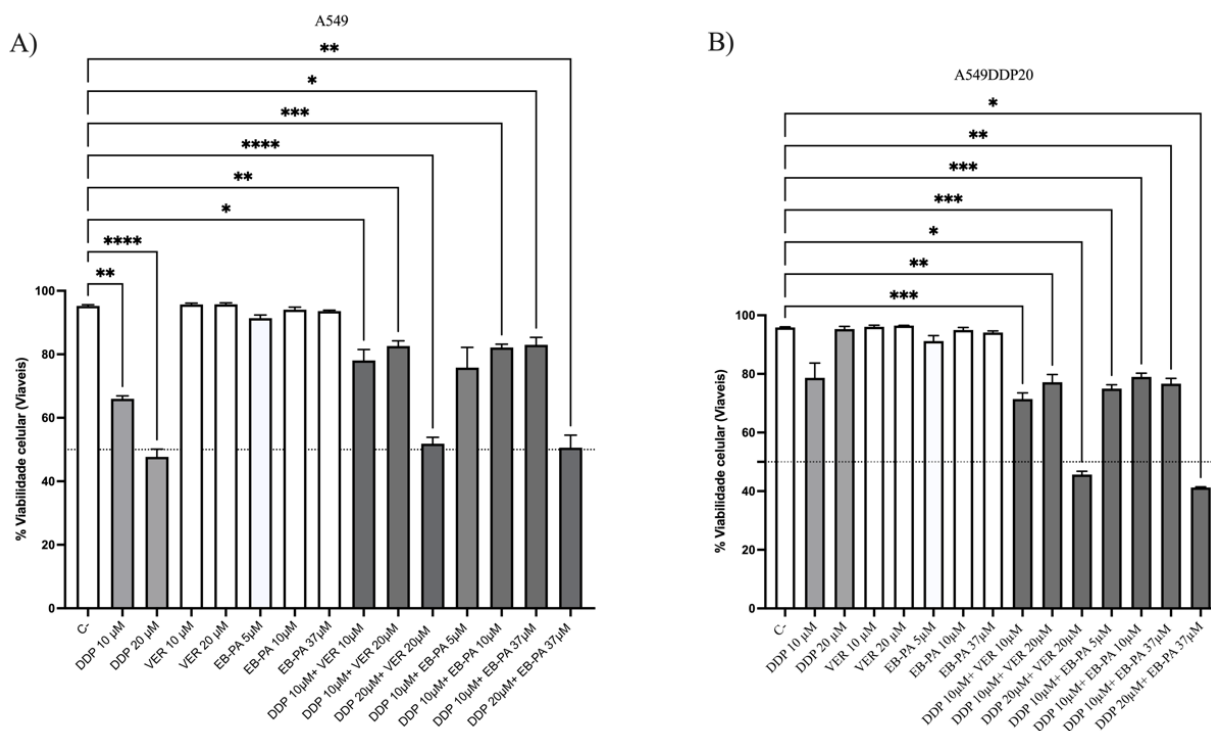


Figura 28- A e B avaliação da viabilidade celular nas linhagens A549 e A549DDP20 respectivamente por citometria de fluxo com iodeto de propídeo. O grupo controle negativo recebeu a mesma quantidade de veículo cuja concentração foi mantida constante (solução salina 0.9%). A DDP (Cisplatina 10 e 20 μM), o Ver (Verapamil 10 e 20 μM) e a EB-PA 5, 10, 37 μM. O Ver e a EB-PA foram pré-incubados 24 horas e posteriormente DDP foi adicionada por 48 horas. Os dados foram apresentados como média ± SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicata calculados pelo Prism 9.0. As análises estatísticas para comparações múltiplas foram realizadas utilizando ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Dunnet. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,004$  e \*\*\*  $p < 0,0005$  foram considerados estatisticamente significativos.

Ao observar a viabilidade celular das células resistentes A549DDP20 observou-se que os compostos isolados (DDP 10 μM e 20 μM, Ver 10 μM e 20 μM, EB-PA 5, 10 e 37 μM não apresentaram diferença estatisticamente significativa ao controle negativo, destacado a falta resposta da cisplatina frente a linhagem resistente. No entanto ao sensibilizar as células com o controle positivo em combinações (DDP 10 μM+ Ver 10 μM, DDP 10 μM+ Ver 20 μM e DDP 20 μM+ Ver 20 μM) de forma que na combinação DDP 20 μM+ Ver 20 μM observou-se maior diminuição da viabilidade celular restaurando a resposta da DDP frente a linhagem resistente.

Nesse contexto, ao avaliar o composto EB-PA nas combinações DDP 10 $\mu$ M+ EB-PA 5 $\mu$ M DDP 10 $\mu$ M+ EB-PA 10 $\mu$ M e DDP 20 $\mu$ M+ Ver 37 $\mu$ M apresentou-se diferença estatisticamente significativa quando comparada aos grupos isolados de DDP, mostrando uma sensibilização por parte do composto EB-PA. Além disso, a predição gerada pelo CompuSyn demonstrou ter o maior sinergismo de obter uma ED<sub>50</sub> proporcional as concentrações testadas. De fato, a queda da viabilidade celular na linhagem A549DDP20 foi mais efetiva na presença de EB-PA 37  $\mu$ M.

Além disso, ao analisar os resultados de densidade celular das linhagens A549 e A549DDP20 (Figura 29a, b) observou-se diferença entre a linhagens parental que a DDP (10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M) teve uma diminuição no crescimento celular e quando comparado com a linhagem resistente não foi observado diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo. Além disso, os compostos isolados em pré-tratamento de 24 horas de verapamil 10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M, EB-PA 5, 10 e 37 $\mu$ M em ambas as linhagens não apresentaram diminuição do crescimento celular.

Ao analisar as 7 combinações na linhagem parental A549 observou-se que não teve alteração da densidade celular quando pre-tratadas com os compostos moduladores (verapamil 10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M, EB-PA 5, 10 e 37 $\mu$ M) no tempo total de 72 horas, exibindo o mesmo comportamento como se a DDP (10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M) estivesse isolada.

No entanto, ao observar o comportamento das 7 combinações observou-se que teve uma diminuição da densidade celular quando pre-tratadas 24 horas antes com os compostos moduladores quando comparado ao grupo controle negativo e os grupos de DDP na linhagem resistente sugerindo que EB-PA nas concentrações de 5, 10 e 37  $\mu$ M sensibilizam as células resistentes concentração dependente. Ao mesmo tempo o controle positivo verapamil 10 e 20  $\mu$ M apresenta um comportamento concentração dependente.

Figura 29-Avaliação da densidade celular nas linhagens A549 e A549DDP20 respectivamente por citometria de fluxo com iodeto de propídeo.

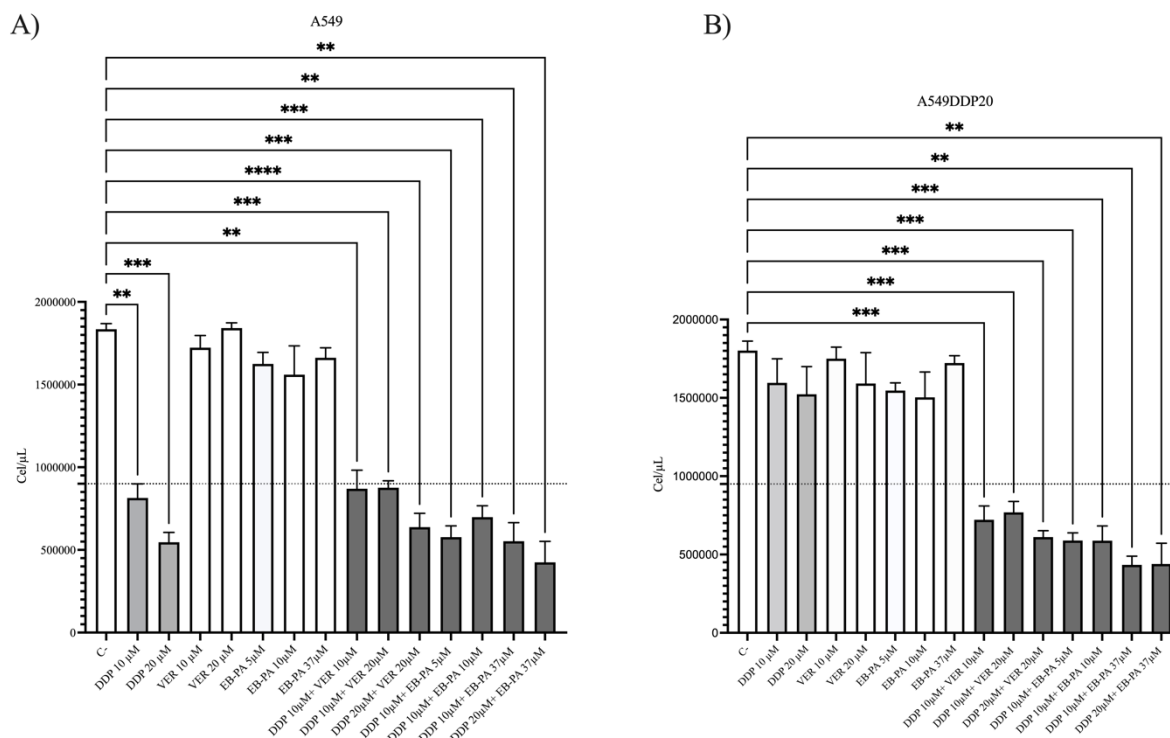


Figura 29- A e B avaliação da densidade celular nas linhagens A549 e A549DDP20 respectivamente por citometria de fluxo com iodeto de propídeo. O grupo controle negativo recebeu a mesma quantidade de veículo cuja concentração foi mantida constante (solução salina 0.9%). DDP (Cisplatina 10 e 20µM), Ver (Verapamil 10 e 20µM) e EB-PA 5, 10, 37 µM. Ver e EB-PA foram pré-incubados 24 horas e posteriormente DDP foi adicionada por 48 horas. Os dados foram apresentados como média ± SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicata calculados pelo Prisma 9.0. As análises estatísticas para comparações múltiplas foram realizadas utilizando ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Dunnet. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,004$  e \*\*\*  $p < 0,0005$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 11.10 Avaliação da sobrevivência através do ensaio clonogenico

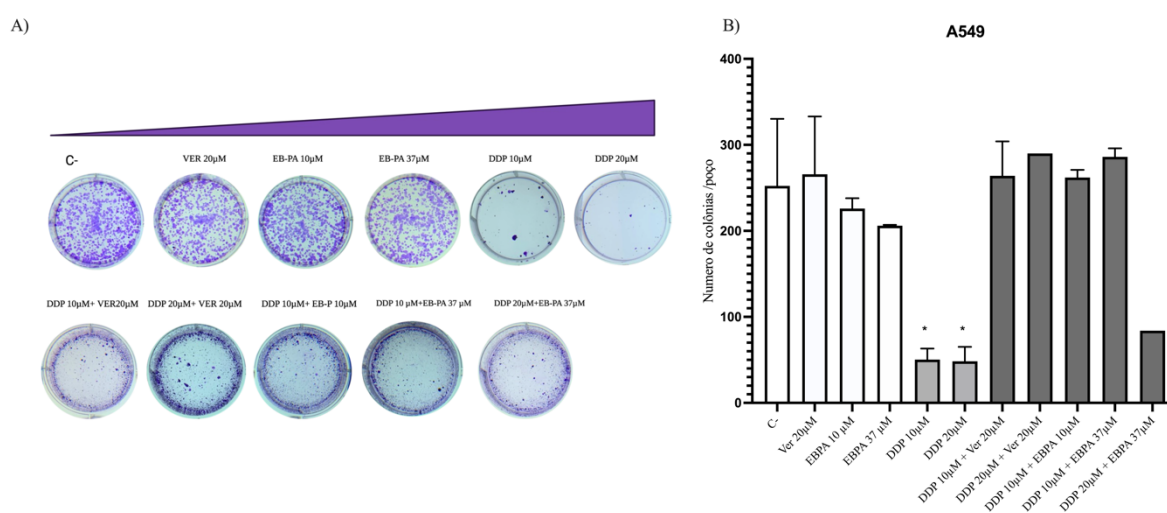
Inicialmente foram escolhidas as melhores concentrações do controle positivo verapamil 20µM e para o composto teste 10 e 37 µM para serem realizadas 5 combinações que apresentaram melhores resultados frente a viabilidade celular para a linhagem A549DDP20, para dar continuidade aos próximos experimentos, começando pela avaliação da sobrevivência do ensaio clonogenico.

Os resultados obtidos no ensaio de sobrevivência são mostrados na figura 30. Observou-se que após de 7 dias de incubação, EB-PA na linhagem A549 não teve alteração na

sobrevivência células nas concentrações testadas de 10 e 37  $\mu\text{M}$  após o pré-tratamento de 24 horas. O mesmo ocorreu na aparência do controle positivo verapamil 20 $\mu\text{M}$ . Por outro lado, a Cisplatina (DDP 10 e 20 $\mu\text{M}$ ) foi capaz de impedir a capacidade das células formarem colônias mostrando diferença estatisticamente significativa. Além disso, houve crescimento celular quando os compostos foram incubados em combinações sem diferença estatística quando comparado ao controle negativo (solução salina 0.9%), mostrando uma leve redução na forma das colônias e espaçamento entre elas (Figura 30 A e B).

Na figura 30C, observa-se os resultados obtidos da linhagem resistente A549DDP20, novamente que a EB-PA não teve alteração na sobrevivência células nas concentrações testadas, da mesma forma o controle positivo verapamil e o DDP 10 e 20  $\mu\text{M}$  sem apresentar diferença estatisticamente significativa. Porém, ao analisar as combinações dos compostos EB-PA e verapamil com o DDP observou-se uma redução estatisticamente significativa da sobrevivência celular, impedindo o crescimento de colônias destacando maior atividade por parte do DDP em combinação com os compostos moduladores (Verapamil e EB-PA) do que isolado (Figura 30A e B).

Figura 30-avaliação da sobrevivência das células tumorais parentais (A549) e resistentes (A549DDP20) *in vitro* através do ensaio clonogenico.



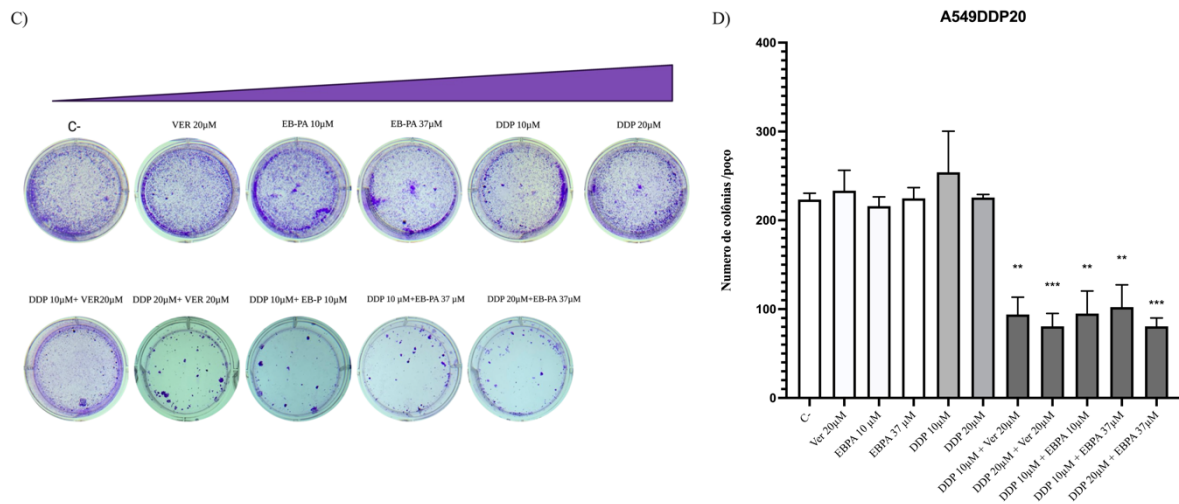


Figura 30- Avaliação da sobrevivência das células tumorais parentais (A549) e resistentes (A549DDP20) *in vitro* através do ensaio clonogenico. **A-C)** Poços de placa de cultura com células A549 e A549DDP20 incubadas por 7 dias após os tratamentos de 72 horas *in vitro*. Grupos: C- (controle negativo solução salina 0.9%), Verapamil 20µM (controle positivo), cisplatina DDP 10 e 20 µM (controle positivo), EB-PA 10 e 37 µM, grupos foram testadas de forma isolada e em combinações. **B-D)** Gráficos com o número de colônias relativo aos poços com células incubadas com todos os grupos teste. Os dados foram apresentados como média ± SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicata calculados pelo Prism 9.0. As análises estatísticas para comparações múltiplas foram realizadas utilizando ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Dunnett. \* p < 0,05, \*\* p < 0,004 e \*\*\* p < 0,0005 foram considerados estatisticamente significativos.

### 11.11 Avaliação do processo de morte celular após o tratamento com EB-PA e cisplatina nas linhagens A549 e A549DDP20 por western blot

Para investigar melhor o papel funcional do composto EB-PA na sensibilização da resistência da linhagem A549DDP20, foram incubados por 24 horas de pré-tratamento o verapamil 20µM e EB-PA 10 e 37µM, seguido da incubação da DDP 10 e 20 µM para poder avaliar apoptose celular pela presença da proteína BAX utilizando western blot. Na detecção de western blot da expressão proteica relacionada à apoptose, descobrimos que na presença dos compostos sensibilizantes na linhagem a A549 não apresentaram diferença estatisticamente significativa, no entanto na presença da DDP 10 e 20 µM aumentou significativamente a expressão de BAX (Figura 31 A).

Além disso ao analisar o processo de morte celular na linhagem A549DDP20 observou-se que o controle positivo (verapamil 20 µM) e EB-PA (10 e 37 µM) e o quimioterápico DDP 10 e 20 µM não apresentaram alta expressão relativa de BAX, porém quando estão em combinação observou-se um aumento da expressão proteica de BAX após o tratamento final de

72 horas (Figura 31 B). Tomando em conjunto, estes resultados apoiaram fortemente que a presença dos reversores de MDR e MRPs aumentou a sensibilidade das células A549/DDP ao DDP.

Figura 31- Expressão da proteína BAX nas linhagens A549 e A549/DDP20 foram medidos por western blot após 72 horas de tratamento.

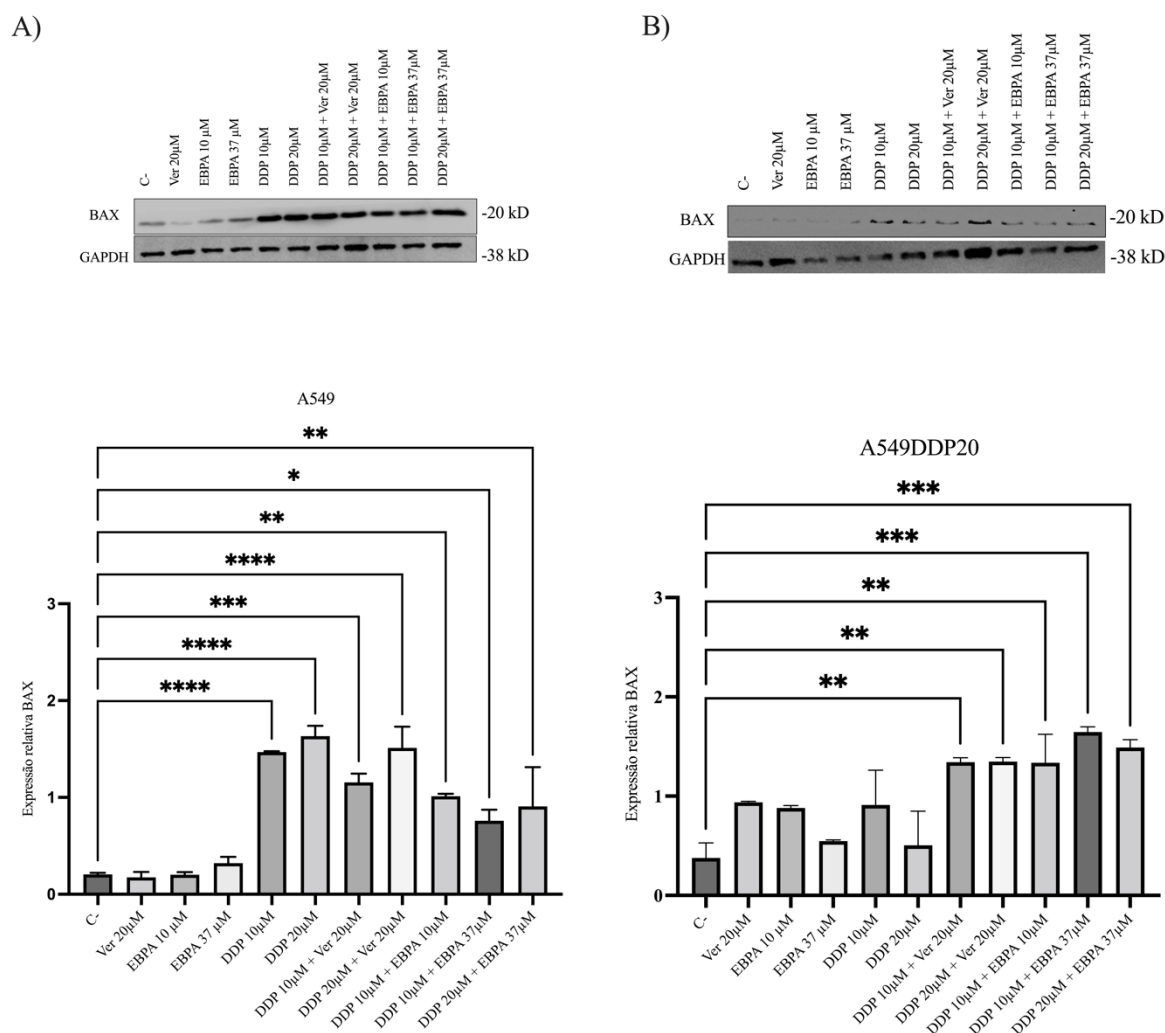


Figura 31- Expressão da proteína BAX nas linhagens A549 e A549/DDP20 foram medidos por western blot após o tratamento na presença e ausência dos reversores de resistência Verapamil (Ver) 20 µM e EB-PA 10 e 20 µM, com o quimioterápico Cisplatina 10 e 20 µM (DDP) após 72 horas de tratamento final. C- (controle negativo solução salina 0.9%). Os dados foram apresentados como média ± SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata calculados pelo Prisma 9.0. As análises estatísticas para comparações múltiplas foram realizadas utilizando ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Dunnet. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,004$  e \*\*\*  $p < 0,0005$  foram considerados estatisticamente significativos.



Em seguida, investigamos se a expressão das proteínas de resistência MDR1, MRP1 e MRP2 estava sendo afetada pelos moduladores ou inibidores EB-PA e verapamil como controle positivo. Nesse contexto, observou-se inicialmente na linhagem parental que após o pré-tratamento de 24 horas com verapamil 20 $\mu$ M e EB-PA 10 e 37 $\mu$ M não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo, da mesma forma os tratamentos de cisplatina (DDP) não apresentou alteração na expressão da proteína MDR1 após 48 horas de tratamento, apresentado o mesmo comportamento nas combinações com DDP+Ver e DDP+EB-PA após o tratamento final de 72 horas. Na linhagem A549DDP20, observou-se o mesmo comportamento, não teve alteração na expressão de proteína MDR1 nenhum dos tratamentos, não apresentando diferença estatisticamente significativa. Nesse contexto a regulação positiva de BAX e a não regulação MDR1 após as combinações com Cisplatina e EB-PA pode estar relacionada a reversão da resistência as drogas das células A549DDP20 (Figura 32 A e C).

Figura 32-Combinação de cisplatina e EB-PA não altera significativamente a expressão da proteína MDR1 nas células A549 e A549DDP20 após 72 horas por western blot.

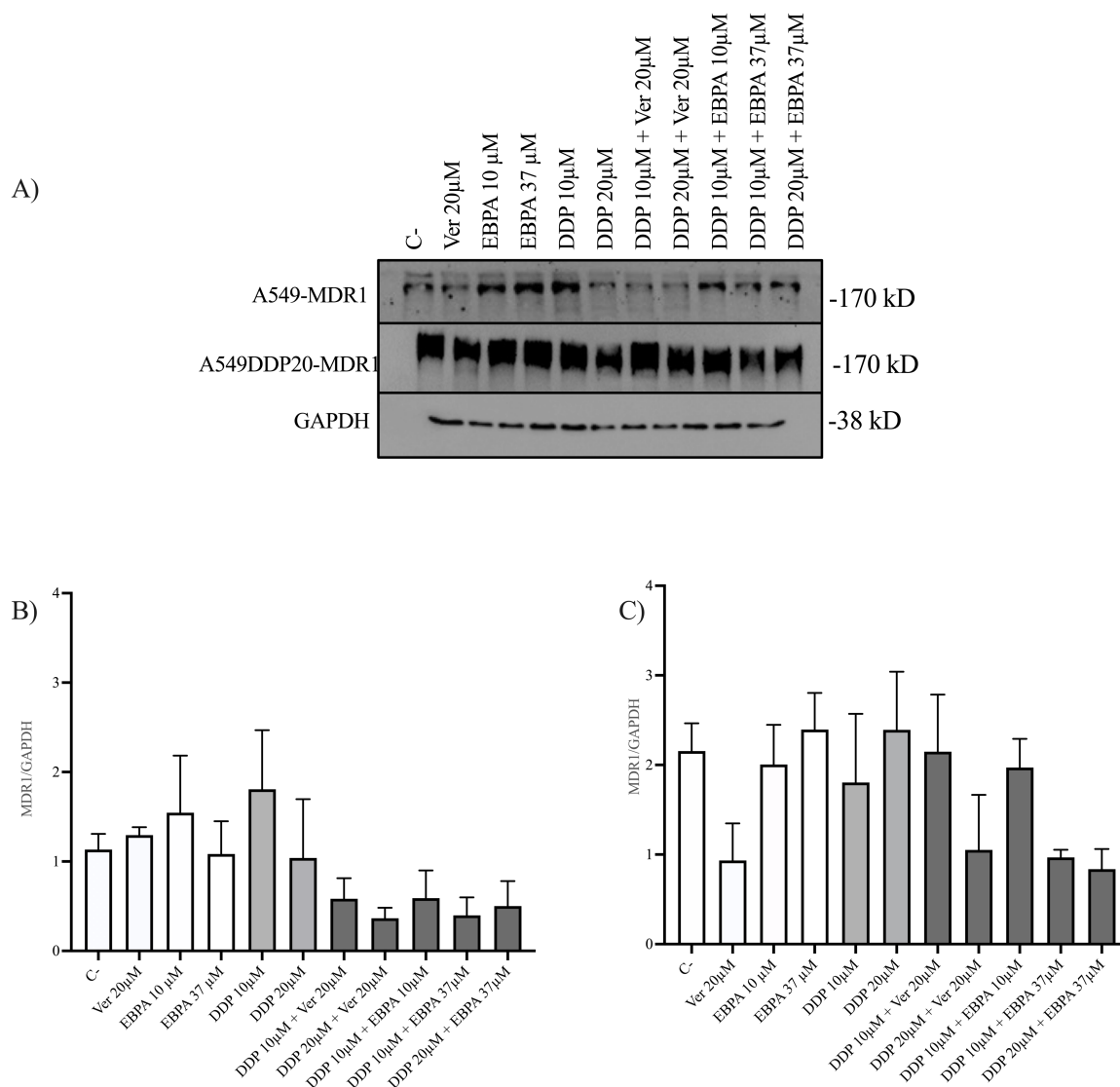


Figura 32 - Combinação de cisplatina e EB-PA não altera significativamente a expressão da proteína MDR1 nas células A549 e A549DDP20 após 72 horas por western blot. Células A549DDP20 foram cultivadas em DMEM com cisplatina, EB-PA (24 h) ou a combinação de cisplatina (48h) e EB-PA conforme indicado durante 72 h. (A) As células A549 e A549DDP20 foram coletadas e submetidas a análises de western blot com anticorpos específicos contra proteína MDR1, e GAPDH. (B linhagem parental e C linhagem resistente) Gráficos da análise de Western blot. DDP (Cisplatina), Ver (Verapamil) utilizando como controle positivo de reversão a resistência a múltiplas drogas, C-(Controle negativo solução salina 0,9%). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata calculados pelo Prisma 9.0. As análises estatísticas para comparações múltiplas foram realizadas utilizando ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Dunnet. \*  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativos.

Continuamente, as mesmas células A549 e A549DDP20 cultivadas da mesma forma com EB-PA por 24 h como pré-tratamento (10 e 37  $\mu$ M) não apresentaram alteração na expressão da proteína MRP1 quando comparado a controle negativo, da mesma forma, mostrando um comportamento similar ao controle positivo (Ver 20 $\mu$ M). Além disso, enquanto a cisplatina isolada não teve efeito sobre a expressão da proteína estatisticamente significativo após a incubação de 48 horas nas concentrações de 10 e 20  $\mu$ M. Dessa forma, ao observar as combinações tanto com verapamil e EB-PA mais o DDP também não apresentaram diferença estatisticamente significativa após de 72 horas de tratamento final (Figura 33 A e C).

Figura 33- Combinação de cisplatina e EB-PA não altera significativamente a expressão da proteína MRP1 nas células A549 e A549DDP20 após 72 horas por western blot

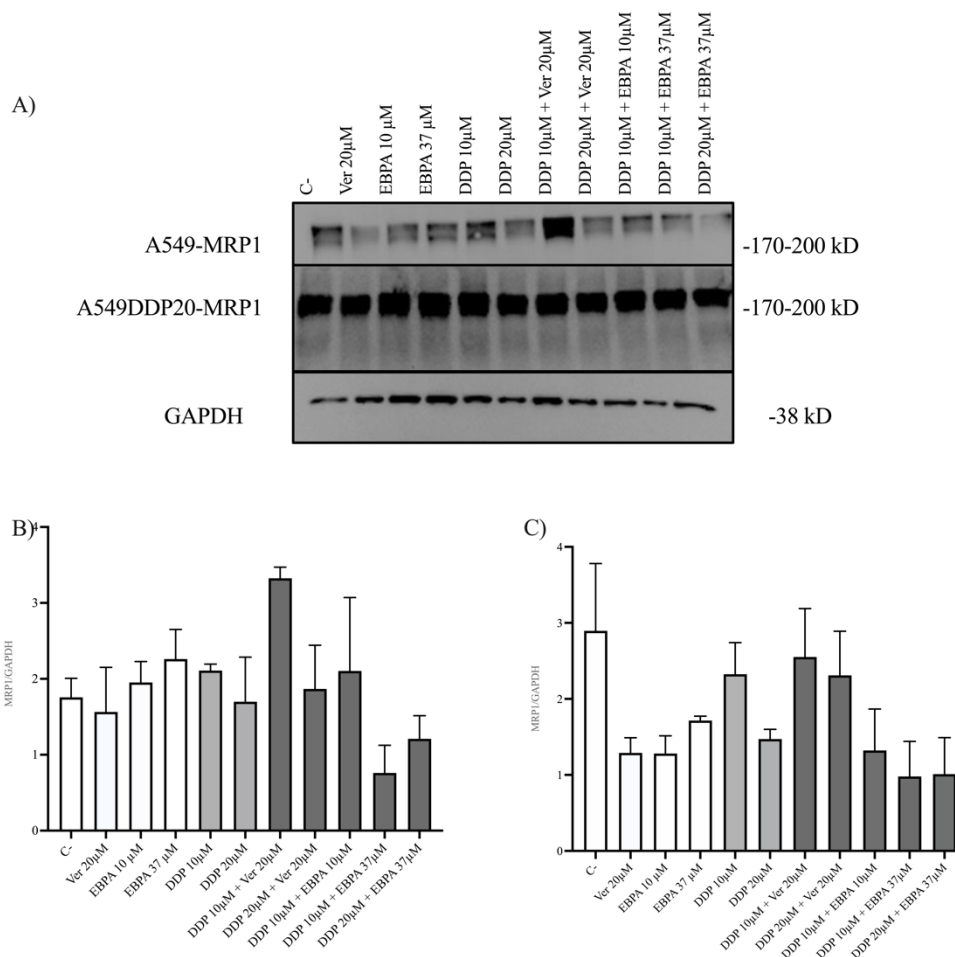


Figura 33- Combinação de cisplatina e EB-PA não altera significativamente a expressão da proteína MRP1 nas células A549 e A549DDP20 após 72 horas por western blot. Células A549DDP20 foram cultivadas em DMEM com cisplatina, EB-PA (24 h) ou a combinação de cisplatina (48h) e EB-PA conforme indicado durante 72 h. (A) As células A549 e A549DDP20 foram coletadas e submetidas a análises de western blot com anticorpos específicos contra proteína MRP1, e GPDH. (B linhagem parental e C linhagem resistente) Gráfico da análise de Western blot. DDP (Cisplatina), Ver (Verapamil) utilizando como controle positivo de reversão a resistência a múltiplas drogas, C-(Controle negativo solução salina 0,9%). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata calculados pelo Prism 9.0. As análises estatísticas para comparações múltiplas foram realizadas utilizando ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Dunnett. \*  $p < 0,05$ , foram considerados estatisticamente significativos.

Além disso, ao analisar o mecanismo através da proteína MRP2 observou-se que EB-PA na concentração de 10 e 37  $\mu$ M isolado no pré-tratamento de 24 horas não teve alteração estatisticamente significativa na linhagem A549DDP20, da mesma a cisplatina não teve alteração da expressão da proteína MRP2 (Figura 34 C). Por outro lado, ao observar o controle positivo (Ver 20  $\mu$ M) apresenta uma regulação negativa na expressão da proteína MRP2, de forma que em tratamento combinado com o quimioterápico DDP (10 e 20 $\mu$ M) apresenta o mesmo comportamento.

Ao avaliar o comportamento molecular do quimioterápico DDP (10 e 20 $\mu$ M) na linhagem A549 após 48 horas de tratamento, observa-se uma regulação positiva da proteína MRP2, quimioterápico considerado como o substrato com maior afinidade pela proteína MRP2, além disso, ao avaliar o comportamento das combinações com o substrato teste, tanto do controle negativo (Ver 20 $\mu$ M) e a EB-PA (10 e 20  $\mu$ M) observou uma regulação positiva da proteína MRP2 quando comparada ao controle negativo, possivelmente pela presença considerada com xenobioticos ativando a extrusão fora da célula.

Figura 34- Combinação de cisplatina e verapamil altera significativamente a expressão da proteína MRP2 nas células A549 e A549DDP20 após 72 horas por western blot

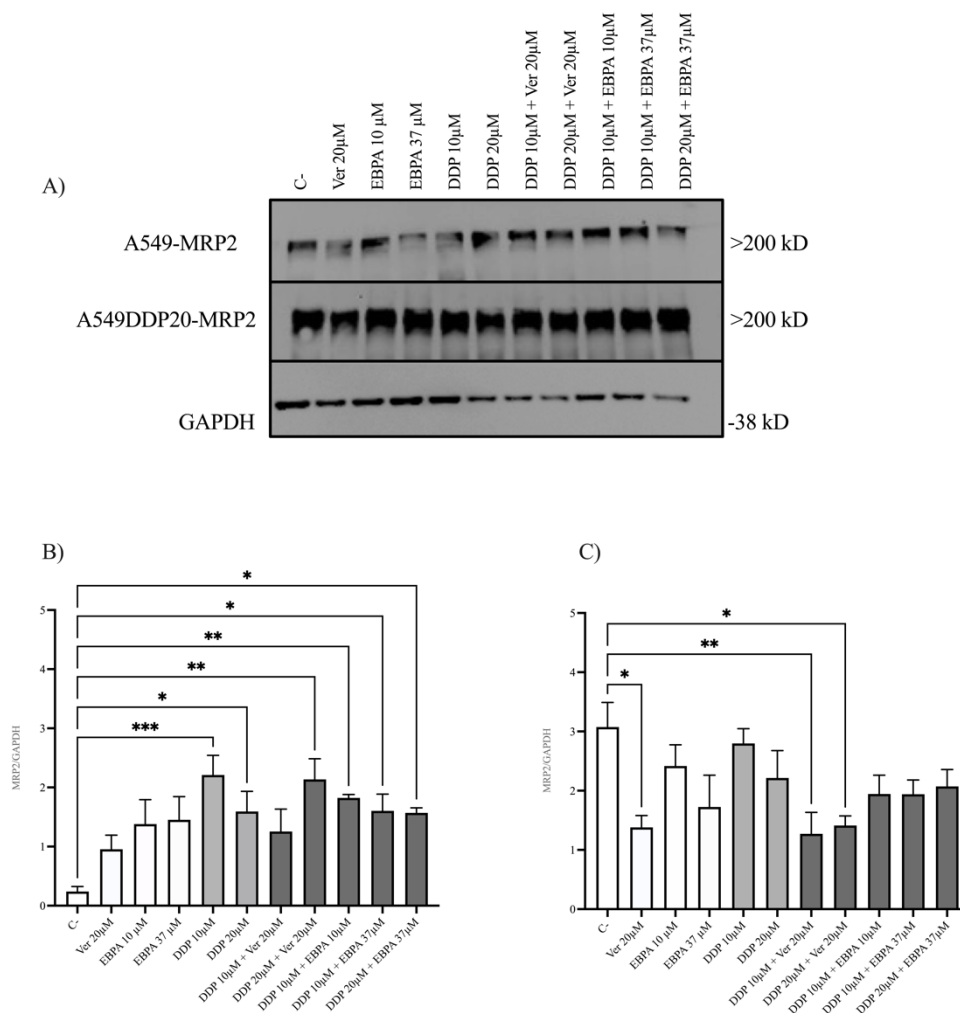


Figura 34- Combinação de cisplatina e verapamil altera significativamente a expressão da proteína MRP2 nas células A549 e A549DDP20 após 72 horas por western blot. Células A549DDP20 foram cultivadas em DMEM com cisplatina, EB-PA (24 h) ou a combinação de cisplatina (48h) e EB-PA conforme indicado durante 72 h. (A) As células A549 e A549DDP20 foram coletadas e submetidas a análises de western blot com anticorpos específicos contra proteína MRP2, e GAPDH. (B) linhagem parental e (C) linhagem resistente) Gráfico da análise de Western blot. DDP (Cisplatina), Ver (Verapamil) utilizando como controle positivo de reversão a resistência a múltiplas drogas, C-(Controle negativo solução salina 0,9%). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata calculados pelo Prism 9.0. As análises estatísticas para comparações múltiplas foram realizadas utilizando ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Dunnet. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,004$  e \*\*\*  $p < 0,0005$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 11.12 Avaliação da modelagem por docking molecular das proteínas MDR1 e MRP1 em complexo com verapamil, EB-PA e EB-PB.

Inicialmente, os complexos formados apresentaram valores RMSD na ordem de 0.759 Å (EB-PA), 1.890 Å (EB-PB) e 1.010 Å (verapamil). Com relação à energia de afinidade (kcal/mol), observamos valores na ordem de -6.0 (MRP1/EB-PA), -6.6 (MRP1/EB-PB) e -5.0 (MRP1/verapamil). Analisando os padrões de interação observamos que o complexo MRP1/EB-PA apresentou três ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Ser 689A (2.46 Å), Gln 713A (3.20 Å), Gln 714A (2.22 Å), uma interação hidrofóbica com Trp 716A (3.98 Å), uma  $\pi$ -Stacking com Trp 716A (4.09 Å) e uma Salt Bridges com Glu 694A (5.38 Å).

O complexo MRP1/EB-PB apresentou três interações hidrofóbicas com os resíduos Tyr 710A (3.82 e 3.93 Å), Pro 712A (3.87 Å) e quatro ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Tyr 710A (1.84 e 2.70 Å), Gln 713A (3.45 Å) e Gln 714A (2.56 Å). O complexo MRP1/verapamil apresentou sete interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Tyr 737A (3.75 Å), Tyr 747A (3.30, 3.78 e 3.87 Å), Leu 750A (3.53 e 3.71 Å), Glu 751A (3.88 Å) e uma ligação de hidrogênio com o resíduo e Arg 723A (2.75 Å) (Figura 35)

Figura 35-Complexo de interação entre EB-PA (A), EB-PB (B) e controle Verapamil (C) contra MRP1 humana.

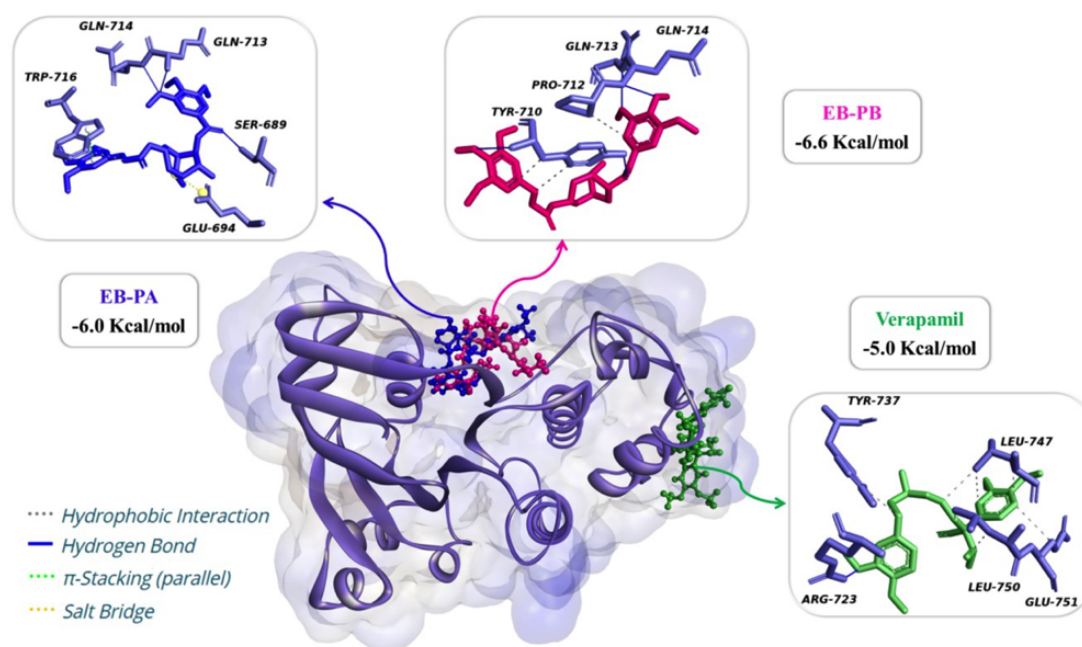


Figura 35- Complexo de interação entre EB-PA (A), EB-PB (B) e controle Verapamil (C) contra MRP1 humana. A análise dos dados foi realizada utilizando os softwares UCSF Chimera™ (KIM; CHEN, 2018)2, *Discovery studio visualizer™ viewer* e *Pymol*. As interações moleculares e ligações de hidrogênio foram calculadas utilizando o Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (ADASME et al., 2021; SALENTIN et al., 2015).

Além disso, os complexos formados apresentaram valores RMSD na ordem de 1.859 Å (EB-PA), 0.489 Å (EB-PB) e 1.113 Å (verapamil). Com relação à energia de afinidade (kcal/mol), observamos valores na ordem de -9.4 (Pgp/EB-PA), -9.5 (Pgp/EB-PB) e -8.1 (Pgp/verapamil). Analisando os padrões de interação observamos que o complexo Pgp/EB-PA apresentou seis ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Arg-905A (2.86, 2.92 e 3.06 Å), Asp-1171A (3.00 Å), Thr-1174A (2.69 Å), Lys-1181A (2.82 Å) e uma Salt Bridges com Arg-905A (4.54 Å) (Figure 36).

O complexo Pgp/EB-PB apresentou cinco interações hidrofóbicas com os resíduos Gln-475A (3.69 Å), Val-478A (3.66 Å), Arg-905A (3.75 Å), Asp-1171A (3.78 Å), Thr-1174A (3.80 Å), nove ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Gln-475A (2.90 Å), Glu-476A (2.22 Å), Arg-905A (2.10 e 2.55 Å), Thr-906A (3.05 Å), Asp-1171A (2.92 e 3.27 Å), Gln-1175A (3.59 Å), Gly-1178A (2.69 Å) e uma Salt Bridges com Lys-1172A (5.41 Å) (Figure 2B). O complexo Pgp/verapamil apresentou duas interações hidrofóbicas com os resíduos Glu-476A (3.55 Å), Arg-905A (3.84 Å), quatro ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Gln-438A (3.03 Å), Ser-474A (3.19 Å), Arg-905A (2.47 Å), Thr-1174A (2.10 Å), uma interação  $\pi$ -Cation com Lys-1181A (4.43 Å) e uma Salt Bridges com Asp-555A (5.47 Å) (Figure 36).

Figura 36-Complexo de interação entre EB-PA (A), EB-PB (B) e controle Verapamil (C) contra Pgp-1 (MDR1) humana.

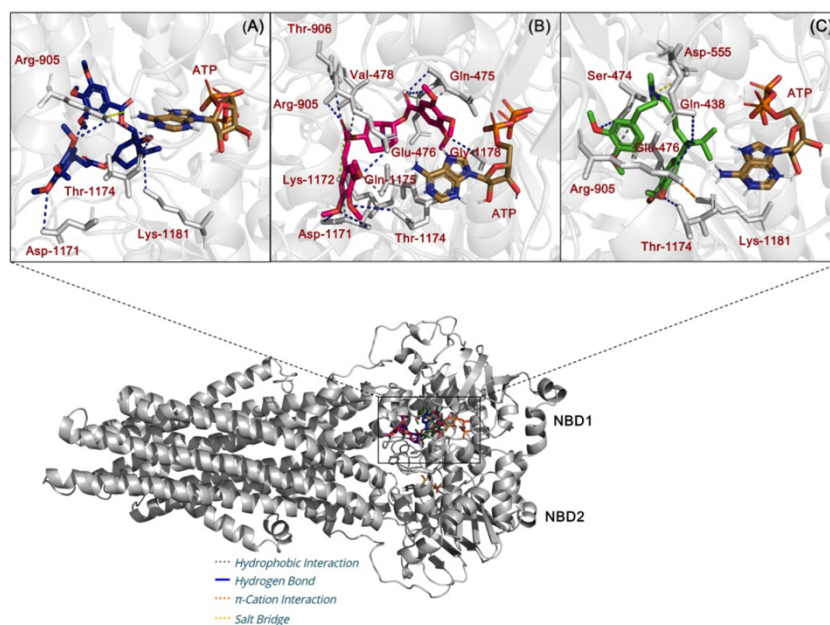


Figura 36- Complexo de interação entre EB-PA (A), EB-PB (B) e controle Verapamil (C) contra Pgp-1 (MDR1) humana. Os dados foram analisados utilizando os softwares UCSF Chimera <sup>TM</sup> (ADASME et al., 2021; SALENTIN et al., 2015)6, *Discovery studio visualizer* <sup>TM</sup> viewer MENDELEY CITATION PLACEHOLDER 17 e *Pymol* MENDELEY CITATION PLACEHOLDER 18. As interações moleculares e ligações de hidrogênio foram visualizadas utilizando o servidor Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (Adasme et al., 2021; Salentin et al., 2015).

## 12. DISCUSSÃO

O objetivo principal do trabalho foi uma vez caracterizado o modelo *in vitro*, avaliar os efeitos citotóxicos dos AKTs derivados da espécie *Erythroxylum Bezerreae* e seu possível efeito na resistência a drogas (MDR) em uma linhagem de câncer de pulmão humano resistente a cisplatina (A549DDP20 modelo para triagem) comparando seus efeitos também com a linhagem parental de câncer de pulmão (A549) assim como, avaliar sua combinação com o substrato cisplatina. Nesse contexto, após a caracterização do modelo biológico *in vitro* de triagem para inibidores de MDR continuou-se com a segunda fase de avaliação de quimiosensibilização.

No ano 2020, foram avaliadas a citotoxicidade dos AKTs derivados da espécie *Erythroxylum Bezerreae* em linhagens tumorais e uma linhagem celular não tumoral *in vitro*. Observando que os AKTs apresentam citotoxicidade significativa frente as linhagens PC-3, HCT-116, NCIH-460 e SNB-19 com valores de  $IC_{50} < 40 \mu M$  (Brito et al., 2020). Dentre os compostos testados destacam-se o EB-PB com valores de  $IC_{50} 5,43 \mu M$  na linhagem NCIH-460 de câncer de pulmão e uma  $IC_{50}$  de  $3,38 \mu M$  para a linhagem de câncer colorretal HCT-116 após 72 horas de incubação. Posteriormente, com os resultados de Brito e colaboradores, foram realizados mais experimentos a fim de avaliar os possíveis alvos dos AKTs com melhor efeito citotóxico. Nesse contexto foi realizado o índice de seletividade (IS) frente a linhagem não tumoral L929 (Fibroblasto murino) mostrando valores de IS de 3,81 e 6,13 respectivamente mostrando mais seletividade para as linhagens tumorais quando comparada com a linhagem não tumoral. Por outro lado, o composto EB-PA mostrou valores de  $IC_{50}$  mais altos nas linhagens NCIH-460 e HCT-116 de 10,55 e 10,56  $\mu M$  após 72 horas de tratamento respectivamente, mostrando valores de IS  $< 2$ .

As células mais abundantes do corpo humano são os eritrócitos, que possuem abundantes características biológicas e morfológicas, por isso têm sido amplamente explorados no transporte de drogas, como consequência interrupção desse processo inviabiliza o uso de compostos em ensaios posteriores (Greco, 2020). Consequentemente, verificou-se o potencial hemolítico de ambos compostos testados numa concentração  $> 10$  vezes maior do que a  $IC_{50}$  e não apresentaram atividade hemolítica, ou seja, sem dano na membrana plasmática dos eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*).



Os AKTs são uma classe específica de alcaloides e podem ser definidos mais especificamente como todas as moléculas que possuem um sistema de anel tropano (HUANG et al., 2021). Então, ao analisar estruturalmente as duas moléculas na sua estrutura química observa-se que na posição 7 do anel do alcaloide tropano o composto EB-PA apresenta uma hidroxila (-OH) quando comparado ao composto EB-PB que não o apresenta, ou que pode oferecer ligações importantes de hidrogênio com outra molécula (BHAT et al., 2023; BOOBYER et al., 1989).

Nesse contexto, várias moléculas do tipo AKTs derivados do gênero *Erythroxylum* foram descritas anteriormente para prevenir a resistência a drogas e múltiplas drogas no câncer (BRINGMANN et al., 2000; CHÁVEZ et al., 2002). Na procura dos possíveis alvos terapêuticos da EB-PA e EB-PB foi realizado um análise teórico na espécie *Homo sapiens*, mostrando uma probabilidade para a EB-PA para classe de alvo de 13,3% para transportadores ativos, porém para o EB-PB mostra uma probabilidade de 6,7%. Além disso, uma das classes alvos importantes na predição foi o transporte ativo o qual é importante para o funcionamento da resistência a múltiplas drogas (MDR) (LI et al., 2009; REN et al., 2007), observando na predição que a probabilidade maior como alvo terapêutico e a Pg-p1 (ABCB1/MDR1), mostrando diferentes probabilidades para EB-PA e EB-PB de 0,43 e 0,27 respectivamente.

No ano 2001, Mi e colaboradores demonstraram que os AKTs pervilleine A obtidos do extrato clorofórmico das raízes de *Erythroxylum pervillei* após a incubação de células multirresistentes KB-V1 e CEM/VLB apresentaram concentrações de até 45  $\mu\text{M}$  por 72 h (MI et al., 2001). Posteriormente os mesmos pesquisadores isolaram dois novos ésteres aromáticos de AKTs da mesma espécie, os Pervilleines B e C restauraram a sensibilidade à vimblastina (VLB) de KB-V1 (MDR). Além disso, observaram que o Pervilleine F mostrou restaurar a sensibilidade à vimblastina de células KB-V1 multirresistentes cultivadas, com um  $\text{IC}_{50}$  valor de 0,40  $\mu\text{M}$ , também foi capaz de reverter parcialmente a resistência cruzada de células KB-V1 aos agentes anticancerígenos experimentais ou usados clinicamente. Além disso, os pesquisadores avaliaram os compostos mais ativos nas células KB-V1 com 1 ou 3-6 aumentou a acumulação intracelular de corante fluorescente (rodamina 123, Rho-123), confirmando a visualização por microscopia confocal a acumulação intracelular de Rho123 em células KB-V1 resistentes foi significativamente menor do que em células KB-3 sensíveis a fármacos, enquanto o tratamento de células KB-V1 com 10  $\mu\text{M}$  aumentou significativamente a acumulação intracelular (Mi et al., 2002, 2003).

Nesse contexto, frente aos resultados obtidos da avaliação *in silico* e a sua possível atividade como quimiossensibilizadores MDR, teve como objetivo avaliar a capacidade de reverter quimioresistência nas células A549DDP20 *in vitro*. Inicialmente partimos para investigação do efeito na proliferação celular, sobre as linhagens de câncer de pulmão parental (A549) e resistente (A549DDP20). Inicialmente, para os tempos de 24 horas, a EB-PA e EB-PB não apresentaram efeito citotóxico tanto nas linhagens parental e resistente, porém o EB-PB apresentou uma  $IC_{50}$  de 43,43  $\mu$ M na linhagem não tumoral (MRC-5) quando comparadas a verapamil e o DDP. Por outro lado, após 48 horas de incubação o DDP apresentou efeito citotóxico na linhagem MRC-5 sem apresentar efeito citotóxico nas linhagens tumorais. Da mesma forma, o EB-PB apresentou efeito citotóxico na linhagem MRC-5 e na linhagem A549DDP20 DE 11,10 e 21,95  $\mu$ m respectivamente sem apresentar citotoxicidade na linhagem A549. O controle positivo e EB-PA não apresentaram efeito citotóxico.

Além disso, a EB-PA e EB-PB apresentaram atividade citotóxica frente às duas linhagens, mostrando que EB-PA não apresenta alteração significativa na sua  $IC_{50}$ . No entanto, o EB-PB demonstrou ter efeitos mais seletivos para a linhagem resistente, mostrando valores 1,82 vezes de  $IC_{50}$  menor quando comparada com a linhagem parental no tempo de 72 horas, quando comparado ao DDP apresentou um índice de resistência (IR) de 16,13.

Com tudo isso, também se calculou o IR para os compostos EB-PA e EB-PB mostrando valores  $IR < 1$  significando que matam as células MDR de forma mais eficaz do que as células parentais (Ramallete et al., 2018), mostrando sensibilização celular com níveis próximos aos das células parentais originais. Consequentemente foi calculado o índice de seletividade frente a linhagem não tumoral MRC-5, observando um comportamento mais seletivo para a linhagem A549DDP20 do que a sua linhagem parental no tempo de 72 horas. Porém, o EB-PB parece apresentar melhores efeitos citotóxicos de acordo com a sua  $IC_{50}$  em todas as linhagens testadas.

Alguns estudos evidenciam que a Quimiorresistência pode ser atribuída a expressão da proteína MDR1, MRP1 e MRP2 (MRPs), que reduz a captação intracelular de quimioterápicos ou substratos do transportador. Com a finalidade de avaliar a possível modulação sobre o status funcional MDR1 e MRPs foi utilizado o substrato fluorescente Rodamina 123 (Rho-123), tanto a EB-PA e EB-PB tem semelhança estrutural com o verapamil, um protótipo de agente de

reversão bem conhecido de primeira geração (Rogan et al., 1984). Estudos comparativos foram realizados com os dois compostos.

Os resultados do ensaio de efluxo da Rho-123 na linhagem A549 revelaram que a função da MDR1 e MRPs na linhagem parental não teve alteração da Intensidade Mediana de fluorescência (MFI) significativa de efluxo de Rho-123 nos tempos testadas de 3 e 24 horas na presença da EB-PA e EB-PB, exibindo o mesmo perfil do Verapamil ( $20\mu\text{M}$ ). Por outro lado, quando comparado com a linhagem resistente A549DDP20 observou-se um efluxo estatisticamente significativo de Rho-123 quando comparada ao verapamil nos tempos testados, da mesma forma a EB-PA ( $5$  e  $10\mu\text{M}$ ) mostrou valores de MFI sem diferença quando comparado ao controle positivo. No entanto, o comportamento de EB-PB apresentou valores similares ao controle negativo, mostrando uma perda da densidade celular nas concentrações testadas ( $5$  e  $10\mu\text{M}$ ). Também se observou que o verapamil, inibe o transporte de Rho-123, o que indica que Rho-123 e verapamil se ligam à P-gp em locais diferentes. Os dados sugerem a possibilidade de a EB-PA poder modular a proteínas MDR1 ou MRPs em concentrações não tóxicas testadas.

Compostos testados tem demonstrado que alteram o efluxo Rho-123 mediado pelo MDR1 ou MRPs das células MDR, ao contrário do que se observa quando um inibidor clássico da atividade como o verapamil, levar ao acúmulo de Rho-123 no interior das células sugerindo que não são inibidores direto nem um substrato competitivo dessa bomba de efluxo (Huang et al., 2013, Guberović et al., 2018).

Nesse contexto, com o objetivo de investigar mais a fundo, foram consideradas as características de lipofilicidade dos compostos descrita pelo  $i\text{LogP}$  dos AKTs. Pesquisadores anteriormente demonstraram como um descritor molecular para atividade biológica sendo um  $i\text{LogP}$  ótimo de 4,5-5,0 (estimativa Ghose-Crippen LOGP) (Supek et al., 2011). Por tanto calculamos a correlação dos valores do  $i\text{LogP}$  para os compostos candidatos como modulares MDR determinando sua importância. Com isso, a relação entre os valores MFI e  $i\text{LogP}$  foi polinomial, mostrando um pico de atividade de 4,5, mostrando que a EB-PA apresenta possivelmente uma lipofilicidade para entrar na membrana celular e uma plasticidade conformacional para ter ligação com proteínas MDR, porém o EB-PB não apresentou valores significativos. Além disso, ao analisar a razão da atividade de fluorescência (FAR) da EB-PA apresentou um efeito médio nas concentrações de  $5$  e  $10\mu\text{M}$  no tempo de 24 horas de pre-

incubação ( $>1,1-5$ ), observando perfil similar na concentração de  $10\mu\text{M}$  no mesmo tempo, mas com 3 horas o  $\text{FAR}<1$  mostrou um efeito baixo. Ao analisar os dados de EB-PB observou-se que o  $\text{FAR}<1$  mostrando valores não significativos em nenhum tempo testado. Os valores de FAR poder várias dependendo da linhagem testada(Kars et al., 2006).

Uma vez que foi avaliada a inibição do efluxo de rodamina 123 também é importante e crucial avaliar quanto de rodamina 123 como substrato pode ser acumulado. Nesse contexto, foi avaliado o percentual de acumulação de Rho-123 em diferentes tempos, observando que o controle positivo no tempo de 3 horas apresentou o maior percentual de acúmulo de Rho-123 intracelular quando comparado ao controle negativo (Rho-123  $5\mu\text{M}$ ). Além disso, mostrando um comportamento concentração dependente nesse tempo testado, porém ao observar os outros tempos não apresentam diferença estatisticamente significativa da diminuição do acúmulo de Rho-123 intracelular. Ao observar o comportamento de EB-PA nas concentrações de 5 e  $10\mu\text{M}$  apresentam também maior acúmulo intracelular de Rho-123 mostrando ter seu maior efeito no tempo de 3 horas, no entanto ao observar os tempos de 6, 12 e 24 horas o % de Rho-123 vai diminuindo sem apresentar diferença estatisticamente significativa entre os últimos tempos testados. Frente a isso, escolheu-se o composto EB-PA para continuar sua combinação com cisplatina devido que o composto EB-PB não apresentou efeitos moduladores significativos nos tempos e concentrações testadas.

Jouan e colaboradores em 2016, reforçam o fato de que a Rho-123 não é um substrato para o citocromo P-450 3A, ao contrário de muitos outros substratos da MDR, descartando assim a hipótese de que a modulação da Rho-123 celular ou o acúmulo de Rho-123 por alguns inibidores da MDR pode ser devido à interferência com a atividade do citocromo P-450 3A. No entanto, ter em mente ao interpretar os dados do ensaio de transporte de Rho-123 que o corante pode ser parcialmente metabolizado em rodamina 110 por meio de desacetilação seguida por sua glicuronidação. Além disso, o fato de que o potencial de membrana mitocondrial é um fator adicional que contribui para o acúmulo de Rho-123, também deve ser formalmente levado em consideração. Neste contexto, no entanto, é digno de nota que as drogas que interferem com as mitocôndrias geralmente diminuem, e não aumentam, o potencial transmembrana mitocondrial, permitindo assim uma fácil discriminação de drogas que inibem a MDR (que aumentam o acúmulo celular de Rho-123 na MDR expressando células através da inibição de seu efluxo) de drogas que interagem com as mitocôndrias (que reduzem o acúmulo intracelular de Rho-123 através da redução do potencial transmembrana mitocondrial)(Jouan et al., 2016).

Nos últimos anos, as principais pesquisas estão concentradas na exploração direta do segundo uso de fármacos, ou seja, ativos farmacêuticos que são utilizados em função de uma atividade farmacológica principal, mas que tem como propriedade secundária a capacidade de reverter o fenômeno MDR (Zhang et al., 2019). Nesse contexto, em frente aos experimentos preliminares foi escolhido a EB-PA como o composto a ser testado na presença de cisplatina (DDP) para avaliar a nossa hipótese de que ao bloquear a extrusão de DDP com inibidores ou moduladores MDR, este adentre nas células livremente e realizem seu mecanismo de ação, induzindo as células A549DDP20 ao processo de morte celular. A maioria dos quimioterápicos apresentam eficácia quando são administrados de forma isolada na maioria dos pacientes com câncer. Porém efeitos aditivos ou de sinergismo podem aumentar os efeitos de multiplex agentes mostrando melhores efeitos e benefícios clínicos (Duarte; Vale, 2022). Pesquisadores tem investigado diferentes moléculas e diferentes alvos terapêuticos em câncer de pulmão resistente a terapia aproveitando dos avanços tecnológicos para obter melhores benefícios para os pacientes. Os compostos combinados com quimioterápicos não somente pode ser utilizado em combinação se não também para intervir a progressão do crescimento da resistência celular ou patogêneses no paciente promovendo mais tempo de sobrevida (Narayan et al., 2020).

O DDP exibe favoráveis efeitos contra o câncer de pulmão, porém, os pacientes devolvem resistência ao DDP, mas quando o DDP é utilizado em combinação com outros compostos sensibilizadores apresenta efeitos anticâncer favoráveis (Özerkan, 2023; Ranasinghe; Mathai; Zulli, 2022). Além disso, o DDP, tem sido utilizada em diferentes combinações *in vitro*, com diferentes compostos para obter uma diminuição do crescimento celular, diminuindo a ativação de sinalizações e evitar as infiltrações celulares (Liu et al., 2021). Também, vários relatórios avaliaram a eficácia de verapamil e agentes quimioterápicos na terapia combinatória de vários tipos de câncer observando um aumento da sensibilidade das células ao quimioterápico *in vitro* (Tsubaki et al., 2014b; Wong et al., 2020). No entanto, o verapamil apresenta efeitos tóxicos em estudos pré-clínicos e clínicos assim como outros inibidores ou moduladores MDR, impedindo a continuidade do uso em pacientes.

Garcia e Singh, reportaram que bevacizumab em combinação em baixas doses de quimioterápicos descresem o crescimento tumoral. Por outro lado, os alcalóides indólicos, a antofina apresentou efeitos sinérgicos com PTX em células A549-PA e superou a resistência ao PTX (Kim et al., 2003). Em este estudo, cisplatina exibe atividade antiproliferativa *in vitro*,

frente a linhagem A549. Para poder observar efeitos aditivos ou de sinergismo, foi utilizado o software CompuSym, quando o DDP foi combinado com EB-PA (DDP+EB-PA) o grupo apresentou efeitos  $CI > 1$  na linhagem A549. Por outro lado, quando o grupo DDP+EBPA foi testado na linhagem A549DDP20 se obteve um  $CI < 1 (ED_{50}-ED_{90})$ , revelando possíveis combinações para obter fortes efeitos de sinergismo. Ademais, na ED50 observou-se valores de reversão múltipla de 16,46 e 21,43 para o verapamil e EB-PA respectivamente.

Além disso as concentrações testadas mais baixas de DDP+EB-PA apresentaram diminuição da viabilidade e densidade celular observando que DDP teve efeito antiproliferativo nas células A549DDP20 após a pré-incubação com verapamil (10-20 $\mu$ M) e EB-PA (5,10 e 20 $\mu$ M) mostrando um comportamento de concentração dependente, quando comparado a DDP isolada na linhagem parental A549. Observando que o DDP+EB-PA é uma combinação efetiva em baixas concentrações na linhagem A549DDP20. Por outro lado, no ensaio clonogênico na linhagem A549 que EB-PA não teve efeito na sobrevivência das células após incubação quando comparado ao controle negativo mostrando o efeito similar com verapamil. No entanto, o DDP, foi capaz de impedir que as células formassem colônias, observando também uma redução nas combinações testadas. Ao avaliar o DDP nas células A549DDP20 observou-se que não teve alteração na formação de colônias, porém quando foi pré-incubado com o verapamil como controle positivo e a EB-PA observou-se uma diminuição na formação de colônias após o tratamento final de 7 dias. É importante notar que a formação de colônias é apenas uma medida indireta do potencial de crescimento e proliferação celular.

O Bax, um membro da família Bcl-2, desempenha um papel importante na regulação da apoptose (morte celular programada), sua expressão pode influenciar a formação de colônias no câncer. Se a expressão de Bax estiver reduzida nas células cancerosas, isso pode levar à supressão da apoptose (El-sisi et al., 2020; Funk et al., 2020). No contexto das células cancerosas, observou-se que a superexpressão de proteínas MDR1, MRP1 e MRP2 está associada à resistência a múltiplos medicamentos. Em alguns estudos, foi sugerido que a expressão de MDR poderia estar inversamente relacionada à expressão de genes pró-apoptóticos como o Bax. Ou seja, quando as células cancerígenas superexpressam proteínas MDR ou MRPs para serem resistentes a medicamentos, a capacidade de ativar a apoptose através de genes como o Bax também pode ser afetada (Wu et al., 2011).

Matsumoto e colaboradores (2016), sugerem que a indução de Bax pela cisplatina é importante para a indução de apoptose em células SCLC e NSCLC. Por outro lado, a desregulação das vias reguladoras do crescimento através da aquisição de independência do fator de crescimento, supressão do sistema imunitário, indução de sinais anti-apoptóticos para contrariar a ação de fármacos, ativação de vários mecanismos de reparação do DNA e condução do efluxo ativo de drogas do citoplasma celular levam o desenvolvimento de vários mecanismos celulares para aumentar a sua sobrevivência e progressão, bem como a sua resistência à terapia antineoplásica (Kryczka et al., 2021).

Em este estudo, ao observar uma diminuição no crescimento celular nas combinações tem como consequência maior apoptoses em combinação do que o DDP isolado. Nesse contexto, foi observado que nas combinações na linhagem na A549DDP20 apresentam expressão do BAX nos grupos DDP+VER e DDP+EB-PA quando comparado ao controle negativo e quando o DDP foi incubado isolado. Por outro lado, o DDP apresenta maior expressão de BAX na linhagem A549 quando comparado ao controle negativo, porém nos grupos DDP+VER e DDP+EB-PA observou-se um aumento da expressão do BAX. Os grupos isolados VER e EB-PA não apresentaram diferença estatisticamente significativa em ambas as linhagens.

A inibição MDR pode ser categorizada em inibição direta e indireta, referindo-se aos mecanismos pelos quais os agentes atuam no sentido de restaurar a sensibilidade das células tumorais a medicamentos que originalmente eram ineficazes devido à resistência desenvolvida. A inibição direta da MDR: Neste caso, os compostos ou agentes são capazes de direta e especificamente bloquear as proteínas de resistência para que os medicamentos possam permanecer dentro das células cancerosas, aumentando sua eficácia. A inibição indireta da MDR, atua de maneira mais abrangente e pode não ser específica para as proteínas de resistência. Ela pode envolver diferentes mecanismos, como a modulação do microambiente tumoral, a regulação de vias de sinalização celular ou a indução de apoptose nas células tumorais resistentes. Isso pode aumentar a sensibilidade das células tumorais aos medicamentos, tornando a resistência menos eficaz (Emran et al., 2022b; Mansoori et al., 2017).

O bloqueador dos canais de cálcio verapamil inibe a função de transporte do MDR1. Uma hipótese sugere que o verapamil leva a um ciclo ineficaz de hidrólise de ATP; conseqüentemente, o gasto energético não está sendo acoplado à translocação do substrato.

Outra hipótese é que o verapamil compete com o transporte de outras drogas. Embora o verapamil atue para reverter a MDR nas células cancerígenas, o mecanismo subjacente permanece obscuro (Kryczka et al., 2021). Tsubaki e colaboradores (2014) demonstraram que o verapamil e o dasatinib inibem as expressões de MDR1 em células de mieloma resistentes.

Nos estudos de Mi e colaboradores nos anos 2001 e 2002 observaram que os alcaloides tropanos da família Erytroilxaceae não afetaram a expressão das proteínas MDR1 carcinoma epidermoide oral multirresistente, propondo que os ésteres de tropano deste tipo podem reverter o fenótipo de resistência a múltiplas drogas, presumivelmente interagindo com a glicoproteína P. Além disso, os alcaloides como Tetrametilpirazina (TMP) modulam a glicoproteína P na linha celular de câncer de mama humano MCF-7/DOX (ZHANG et al., 2012). Além disso, foi observado que o TMP poderia aumentar a sensibilidade das células de câncer retal multirresistentes aos quimioterápicos quando combinado com 5-FU (HU et al., 2016).

Neste estudo, foi observado que a EB-PA após o tempo de incubação nas células A549 e A549DDP20 não teve alteração da expressão das proteínas MDR1, MRP1 e MRP2 quando comparada ao controle negativo de forma isolada e em combinação com o DDP. Além disso, o controle positivo verapamil apresentou regulação negativa da expressão proteica de MRP2 nas células resistentes, no entanto, na linhagem A549 apresentou uma regulação positiva na proteína MRP2. Além disso, ao avaliar o comportamento das combinações com o substrato teste na linhagem parental, tanto do controle negativo (Ver  $20\mu\text{M}$ ) e a EB-PA (10 e  $37\mu\text{M}$ ) observou-se uma regulação positiva da proteína MRP2 quando comparada ao controle negativo, possivelmente pela presença considerada com xenobioticos ativando a extrusão fora da célula ou mostrando uma maior afinidade a proteína MRP2 pelo DDP. Ke e colaboradores (2013) demonstraram que a cisplatina tem um papel de regulação positiva da proteína MRP2 nas células NCIH-446. No entanto, o papel de MRP2 na formação de MDR associado ao câncer do pulmão ainda é incerto e isto é importante para lidar com a resistência a múltiplos fármacos associados ao câncer do pulmão (Ke et al., 2013a). Korita e colaboradores relataram que a expressão de MRP2 determina a eficácia da quimioterapia à base de cisplatina em pacientes com carcinoma hepatocelular (Pv et al., 2010).

Muitos estudos sugeriram que a expressão de proteínas de resistência está associada a diversas vias de sinalização celular (Mansoori et al., 2017). Proteínas quinases, acompanhantes, enzimas relacionadas à ubiquitina e fatores de transcrição regulam a sensibilidade das células



aos medicamentos anticâncer, controlando a expressão proteica, assim como vários microRNAs também demonstraram modular a transcrição do mRNA do MDR1, MRP1 e MRP2. Em base a isso, diversas análises moleculares estão em andamento em muitos laboratórios, em um esforço para compreender seu controle e regulação biológica e para estabelecer novas estratégias para aumentar a eficácia clínica de agentes anticâncer (Katayama; Noguchi; Sugimoto, 2014).

Frente aos resultados obtidos neste estudo, observou-se a possibilidade do alcaloide tropano EB-PA apresentar efeitos na reversão de múltiplas drogas na linhagem resistente A549DDP20, porém é necessário aprofundar os possíveis mecanismos moleculares que induzem a modulação de mecanismos de resistência. Existem alternativas promissoras que dependem de técnicas computacionais para fornecer novos insights sobre os principais aspectos que são determinantes para entender como o efluxo de MDR pode ser efetivamente revertido. Com a contribuição de métodos computacionais baseados em ligantes ou baseados em estruturas, o efluxo de drogas P-gp 1 (MDR1) e MRP1 está lentamente se tornando um processo dinâmico e reativo, em vez de uma simples resposta à ligação de drogas, com a complexa arquitetura dos transportadores ABC desempenhando um papel determinante não apenas em reconhecimento de drogas (Ferreira; Ferreira; dos santos, 2015). Os experimentos *in Silico* são métodos promissores para fazer previsões sobre as interações de moléculas com o local de ligação ao medicamento de um alvo como P-gp-1, BCRP e MRP1. Estudos de docking molecular podem ajudar a encontrar os fitoquímicos com melhor afinidade para o local de ligação do medicamento que devem ser usados como moléculas líderes para estudos posteriores. Os domínios de ligação a nucleotídeos (NBD) desses transportadores ABC são partes proteicas hidrofílicas (Jones e George, 2002). Além das ligações de hidrogênio essenciais que desempenham um papel crucial na manutenção da estabilidade e função das biomoléculas, os moduladores com porções hidrofóbicas mostram frequentemente afinidades com os NBDs.

Liao e colaboradores confirmaram que o alcaloide benzolisoquinolina tetrandrina tem capacidade inibitória e sua afinidade de ligação é próxima ao verapamil e suas posições de acoplamento são semelhantes. A maior parte da tetrandrina é fixada em uma bolsa lipofílica formada pelos aminoácidos Ala729, Ala987, Ileu306, Ileu340, Leu339, Leu65, Leu975, Met69, Met986, Phe303, Phe336, Phe343, Phe728, Phe732, Phe983, Tyr307, Tyr310 (LIAO et al., 2019). Outro subtipo de alcalóides, como a piperina, foi examinada por Syed e colaboradores (2016) revelando que as interações hidrofóbicas com a P-gp ocorreram nas seguintes posições:

Leu339, Met69, Met986, Phe72, Phe336, Phe728, Phe983, Tyr953 e Val982. Além disso, foi estabelecida uma ligação H com Tyr307. Posteriormente foram desenvolvidos dois análogos de piperina que apresentaram melhor interação hidrofóbica com a maioria dos aminoácidos mencionados (Basha syed; Selvaraj Coumar, 2016; Syed et al., 2017)

Neste estudo, resíduos conservados na estrutura de uma enzima são importantes para dobramento adequado, atividade catalítica e estabilidade (Kragelund et al., 1999; Nezhad et al., 2023). Através da análise das interações observamos que EB-PB interagiu com Gln-475, um resíduo altamente conservado no Q loop do NBD1 (nucleotide-binding domain) da Pgp-1, além disso, Gln-475 é um dos resíduos que compõe o sítio de ligação do ATP, logo, EB-PB pode ser capaz de inibir a ligação do ATP, e, desse modo, pode atuar frente a Pgp inibindo a expulsão de medicamentos para fora da célula cancerígena (Dhasmana et al., 2018). Comparando ao controle verapamil, a EB-PA e o EB-PB apresentaram melhores valores de energia de afinidade, também apresentaram ligação de hidrogênio com o resíduo Gln 713A do sítio de ligação do ATP logo, EB-PA e EB-PB podem ser capazes de inibir a ligação do ATP na proteína MRP1, desse modo, podem impedir a expulsão de medicamentos para fora da célula cancerígena, hipótese que precisa ser confirmada (Dhasmana et al., 2018).

### 13. CONCLUSÃO

Principalmente observou-se que a cisplatina (DDP) em combinação com o alcaloide tropano EB-PA inibe a proliferação celular e se potencializa a apoptose celular em células A549DDP20 *in vitro*. Nesse contexto, o efeito do tratamento da combinação do DDP e a EB-PA nas células A549DDP20 foi melhor do que o do quimioterápico isolado, mostrando a EB-PA não ter efeito citotóxico no tempo de 24 nas concentrações testadas, mostrando ser o responsável pelo efeito citotóxico o DDP. No entanto, também foi observado que o EB-PB apresenta efeitos citotóxicos com alto potencial para posteriores estudos de mecanismo de ação, no entanto neste estudo não apresentou efeitos de modulação MDR. Através dos resultados obtidos de docking molecular inferimos que a EB-PA apresentou melhores valores de energia de afinidade frente as proteínas MRP1 e MDR1 comparando ao controle verapamil, interagindo com o resíduo do sítio de ligação do ATP, ou que possibilita a hipótese que a EB-PA inibe a função de transporte das proteínas MDR1 e MRP1. Tomadas em conjunto, a terapia combinada poderia servir como base teórica para compreender a MDR e melhorar o tratamento do câncer de pulmão.

#### 14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABELOFF, M. D. et al. Changes in morphologic and biochemical characteristics of small cell carcinoma of the lung: A clinicopathologic study. **The American Journal of Medicine**, v. 66, n. 5, p. 757–764, 1 maio 1979.

ADAMSKA, A.; FALASCA, M. ATP-binding cassette transporters in progression and clinical outcome of pancreatic cancer: What is the way forward? **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 29, p. 3222–3236, 7 ago. 2018.

ADASME, M. F. et al. PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W530–W534, 2 jul. 2021.

ALTENBERG, G. A. et al. Cell Biology Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: Evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane. v. 91, p. 4654–4657, 1994.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Lung Cancer Survival Rates | 5-Year Survival Rates for Lung Cancer | American Cancer Society**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>>. Acesso em: 9 set. 2024.

AMIN, K.; DANNENFELSER, R. M. In vitro hemolysis: Guidance for the pharmaceutical scientist. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 6, p. 1173–1176, 2006.

ASHRAFI, A. et al. Current Landscape of Therapeutic Resistance in Lung Cancer and Promising Strategies to Overcome Resistance. **Cancers**, v. 14, n. 19, 1 out. 2022.

BABA AI, C. C.; BUCHAREST (RO). **CARCINOGENESIS - Comparative Oncology - NCBI Bookshelf**. [s.l: s.n.].

BALLESTRERI, É. et al. Resistance mechanism to cisplatin in NCI-H460 non-small cell lung cancer cell line: investigating apoptosis, autophagy, and cytogenetic damage. **Cancer Drug Resistance**, v. 1, n. 1, p. 72–81, 19 mar. 2018.

BANERJEE MUSTAFI, S. et al. MDR1 mediated chemoresistance: BMI1 and TIP60 in action. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1859, n. 8, p. 983, 1 ago. 2016.

BASHA SYED, S.; SELVARAJ COUMAR, M. P-Glycoprotein Mediated Multidrug Resistance Reversal by Phytochemicals: A Review of SAR & Future Perspective for Drug Design. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 16, n. 22, p. 2484–2508, 12 jul. 2016.

BASUMALLIK, N.; AGARWAL, M. Small Cell Lung Cancer. **StatPearls**, 10 jul. 2023.

BATISTA DE ANDRADE NETO, J. et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, n. June 2021, p. 104892, jun. 2021.

BHAT, A. A. et al. Structure activity relationship (SAR) and anticancer activity of pyrrolidine derivatives: Recent developments and future prospects (A review). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 246, p. 114954, 15 jan. 2023.

BOOBBYER, D. N. A. et al. New Hydrogen-Bond Potentials for Use in Determining Energetically Favorable Binding Sites on Molecules of Known Structure. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 5, p. 1083–1094, 1 maio 1989.

BORST, P. et al. A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 16, p. 1295–1302, 16 ago. 2000.

BRINGMANN, G. et al. Tropane alkaloids from *Erythroxylum zeylanicum* O.E. Schulz (*Erythroxylaceae*). **Phytochemistry**, v. 53, n. 3, p. 409–416, 2000.

BRITO, L. S. DE O. et al. Tropane alkaloids from the stem bark of *Erythroxylum bezerrae*. **Phytochemistry**, v. 178, 1 out. 2020.

BRIX, N. et al. The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation. **Radiation Oncology**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2020.

CETINTAS, V. B. et al. Cisplatin resistance induced by decreased apoptotic activity in non-small-cell lung cancer cell lines. **Cell Biology International**, v. 36, n. 3, p. 261–265, mar. 2012.

CHÁVEZ, D. et al. Reversal of multidrug resistance by tropane alkaloids from the stems of *Erythroxylum rotundifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 606–610, 2002.

CHENG, Q. et al. Cellular Physiology and Biochemistry Cellular Physiology and Biochemistry Asiatic Acid (AA) Sensitizes Multidrug-Resistant Human Lung Adenocarcinoma A549/DDP Cells to Cisplatin (DDP) via Downregulation of P-Glycoprotein (MDR1) and Its Targets. **Cell Physiol Biochem**, v. 47, p. 279–292, 2018.

CHOU, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer research**, v. 70, n. 2, p. 440–446, 15 jan. 2010a.

CHOU, T.-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 440–446, 15 jan. 2010b.

CORDEIRO, L. S.; LOIOLA, M. I. B. Flora do Ceará, Brasil: Erythroxylaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 2, p. 881–903, 1 abr. 2018.

CSIZMADIA, P. **MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web**. Proceedings of The 3rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. **Anais...Basel**, Switzerland: MDPI, 1 nov. 1999.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports** 2017 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–13, 3 mar. 2017.

DE, M. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. e-213700, 6 fev. 2023.

DE OLIVEIRA, S. L. et al. Tropane alkaloids from erythroxyllum caatingae plowman. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 155–165, 2011.

DHASMANA, D. et al. Targeting Nucleotide Binding Domain of Multidrug Resistance-associated Protein-1 (MRP1) for the Reversal of Multi Drug Resistance in Cancer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11973, 10 ago. 2018.

DRÄGER, B. **Chemistry and biology of calystegines**. **Natural Product Reports**, abr. 2004.

DUARTE, D.; VALE, N. Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology. **Current Research in Pharmacology and Drug Discovery**, v. 3, 1 jan. 2022.

EL-SISI, A. E. et al. Targeting MDR-1 gene expression, BAX/BCL2, caspase-3, and Ki-67 by nanoencapsulated imatinib and hesperidin to enhance anticancer activity and ameliorate cardiotoxicity. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 34, n. 4, p. 458–475, 1 ago. 2020.

EMRAN, T. BIN et al. Multidrug Resistance in Cancer: Understanding Molecular Mechanisms, Immunoprevention and Therapeutic Approaches. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 1, 23 jun. 2022a.

EMRAN, T. BIN et al. Multidrug Resistance in Cancer: Understanding Molecular Mechanisms, Immunoprevention and Therapeutic Approaches. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 891652, 23 jun. 2022b.

FANG, Y. et al. Transcriptome Sequencing Reveals Key Pathways and Genes Associated with Cisplatin Resistance in Lung Adenocarcinoma A549 Cells. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170609, 1 jan. 2017a.

FANG, Y. et al. Transcriptome sequencing reveals key pathways and genes associated with cisplatin resistance in lung adenocarcinoma A549 cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2017b.

FDA. In Vitro Metabolism-and Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry DRAFT GUIDANCE. 2017.

FERREIRA, R. J.; FERREIRA, M. J. U.; DOS SANTOS, D. J. V. A. Reversing cancer multidrug resistance: Insights into the efflux by ABC transports from in silico studies. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 5, n. 1, p. 27–55, 1 jan. 2015.

FUNK, K. et al. BAX Redistribution Induces Apoptosis Resistance and Selective Stress Sensitivity in Human HCC. **Cancers 2020, Vol. 12, Page 1437**, v. 12, n. 6, p. 1437, 31 maio 2020.

GAGLIA, G. et al. Temporal and spatial topography of cell proliferation in cancer. **bioRxiv**, p. 2021.05.16.443704, 17 maio 2021.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, v. 31, n. 15, p. 1869–1883, 12 abr. 2012.

GAO, Y. et al. Cisplatin-resistant A549 non-small cell lung cancer cells can be identified by increased mitochondrial mass and are sensitive to pemetrexed treatment. **Cancer Cell International**, v. 19, n. 1, p. 1–14, 29 nov. 2019.

GATOULLAT, G.; MADOULET, C. Chemosensibilization. **Encyclopedia of Cancer**, p. 1–4, 2014.



GENOVESE, I. et al. Not only P-glycoprotein: Amplification of the ABCB1-containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins. **Drug Resistance Updates**, v. 32, p. 23–46, 1 maio 2017.

GONÇALVES, B. M. F.; CARDOSO, D. S. P.; FERREIRA, M. J. U. Overcoming Multidrug Resistance: Flavonoid and Terpenoid Nitrogen-Containing Derivatives as ABC Transporter Modulators. **Molecules** 2020, Vol. 25, Page 3364, v. 25, n. 15, p. 3364, 24 jul. 2020.

GOVINDAN, S. V. ALIYAVEEDAN et al. Establishment and characterization of triple drug resistant head and neck squamous cell carcinoma cell lines. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 2, p. 3025–3032, 1 ago. 2015.

HALDER, J. et al. Nanotherapeutics approaches to overcome P-glycoprotein-mediated multi-drug resistance in cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 40, p. 102494, 1 fev. 2022.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5–6, p. 490–519, 1996.

HAN, T. et al. Establishment and characterization of a cisplatin-resistant human osteosarcoma cell line. **Oncology Reports**, v. 32, n. 3, p. 1133–1139, 1 set. 2014.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HANKE, N. T. et al. Characterization of carfilzomib-resistant non-small cell lung cancer cell lines. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 7, p. 1317–1327, 1 jul. 2018.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 13 dez. 2012.

HAQUE, A. et al. Interaction Analysis of MRP1 with Anticancer Drugs Used in Ovarian Cancer: In Silico Approach. **Life**, v. 12, n. 3, 1 mar. 2022.

HILL, B. T. Neuroblastoma-an overview of laboratory studies aimed at inducing tumor regression by initiation of differentiation or administration of antitumor drugs. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 3, n. 1, p. 73–88, 1986.

HOUSMAN, G. et al. **Drug resistance in cancer: An overview**. **CancersMDPI AG**, , 5 set. 2014.

HU, T. et al. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 30, p. 6876, 8 ago. 2016.

HUANG, J. P. et al. Tropane alkaloid biosynthesis: a centennial review. **Natural Product Reports**, v. 38, n. 9, p. 1634–1658, 23 set. 2021.

HUANG, X. C. et al. Parguerenes: Marine red alga bromoditerpenes as inhibitors of P-glycoprotein (ABCB1) in multidrug resistant human cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 1257–1268, 1 maio 2013.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; FORLI, S. **Using autodock 4 and autodock vina with autodocktools : a tutorial**. The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory, , 2012.

INCA. **Câncer de pulmão — Instituto Nacional de Câncer - INCA**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pulmao>>. Acesso em: 9 set. 2024.

JAAP VERWEIJ,KEES NOOTER, G. S. **Medical Oncology**. [s.l.: s.n.].

JANUCHOWSKI, R. et al. Analysis of MDR genes expression and cross-resistance in eight drug resistant ovarian cancer cell lines. **Journal of Ovarian Research**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 18 out. 2016.

JARAMILLO, A. C. et al. How to overcome ATP-binding cassette drug efflux transporter-mediated drug resistance? **Cancer Drug Resistance**, v. 1, n. 1, p. 6–29, 19 mar. 2018.

JONES, P. M.; GEORGE, A. M. A new structural model for P-glycoprotein. **Journal of Membrane Biology**, v. 166, n. 2, p. 133–147, 1998.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253–265, 2004.

JOUAN, E. et al. Evaluation of P-Glycoprotein Inhibitory Potential Using a Rhodamine 123 Accumulation Assay. **Pharmaceutics 2016, Vol. 8, Page 12**, v. 8, n. 2, p. 12, 12 abr. 2016.

KAGE, K. et al. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. **International Journal of Cancer**, v. 97, n. 5, p. 626–630, 10 fev. 2002.

KANINTRONKUL, Y. et al. Overcoming Multidrug Resistance in Human Lung Cancer with Novel Benzo[a]quinolizin-4-ones. **Anticancer Research**, v. 31, n. 3, 2011.

KARS, M. D. et al. Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. **Anticancer Research**, v. 26, n. 6 B, p. 4559–4568, 2006.

KARTHIKA, C. et al. Multidrug Resistance in Cancer Cells: Focus on a Possible Strategy Plan to Address Colon Carcinoma Cells. **Life**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2022.

KATAYAMA, K.; NOGUCHI, K.; SUGIMOTO, Y. Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. **New Journal of Science**, v. 2014, p. 1–10, 20 maio 2014.

KE, S. Z. et al. Camptothecin and cisplatin upregulate ABCG2 and MRP2 expression by activating the ATM/NF- $\kappa$ B pathway in lung cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 42, n. 4, p. 1289–1296, 1 abr. 2013a.

KE, S. Z. et al. Camptothecin and cisplatin upregulate ABCG2 and MRP2 expression by activating the ATM/NF- $\kappa$ B pathway in lung cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 42, n. 4, p. 1289–1296, 1 abr. 2013b.

KIM, S. W. et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by ginsenoside Rg3. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 75–82, 1 jan. 2003.

KIM, Y.; CHEN, J. Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. **Science**, v. 359, n. 6378, p. 915–919, 23 fev. 2018.

KOHNEN-JOHANNSEN, K.; KAYSER, O. Tropane Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Biosynthesis and Production. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 796, 22 fev. 2019.

KRAGELUND, B. B. et al. Conserved Residues and Their Role in the Structure, Function, and Stability of Acyl-Coenzyme A Binding Protein. **Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 2386–2394, 1 fev. 1999.

KRYCZKA, J. et al. Molecular Mechanisms of Chemoresistance Induced by Cisplatin in NSCLC Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, 2 ago. 2021.

KUDOH, K. et al. Gains of 1q21-q22 and 13q12-q14 Are Potential Indicators for Resistance to Cisplatin-based Chemotherapy in Ovarian Cancer Patients 1. 1999.

LI, A. et al. Hypermethylation of ATP-binding cassette B1 (ABCB1) multidrug resistance 1 (MDR1) is associated with cisplatin resistance in the A549 lung adenocarcinoma cell line. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, n. 6, p. 412–421, 1 dez. 2016.

LI, J. et al. Expression of MRP1, BCRP, LRP, and ERCC1 in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer: Correlation With Response to Chemotherapy and Survival. **Clinical Lung Cancer**, v. 10, n. 6, p. 414–421, 1 nov. 2009.

LI, X. Q. et al. A milbemycin compound isolated from *Streptomyces* Sp. FJS31-2 with cytotoxicity and reversal of cisplatin resistance activity in A549/DDP cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 128, p. 110322, 1 ago. 2020.

LIAO, D. et al. Tetrandrine Interaction with ABCB1 Reverses Multidrug Resistance in Cancer Cells Through Competition with Anti-Cancer Drugs Followed by Downregulation of ABCB1 Expression. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 23, 30 nov. 2019.

LIN, K. N. et al. Grape seed proanthocyanidin extract reverses multidrug resistance in HL-60/ADR cells via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 125, n. October 2019, p. 109885, 2020.

LITOVCHICK, L. Immunoblotting. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2020, n. 6, p. 179–188, 1 jun. 2020.

LIU, M. et al. PD-0332991 combined with cisplatin inhibits nonsmall cell lung cancer and reversal of cisplatin resistance. **Thoracic Cancer**, v. 12, n. 6, p. 924–931, 1 mar. 2021.

LIU, Z. et al. Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy. **Medicinal research reviews**, v. 36, n. 2, p. 313, 1 mar. 2016.

LIU, Z. L. et al. Apatinib resensitizes cisplatin-resistant non-small cell lung carcinoma A549 cell through reversing multidrug resistance and suppressing ERK signaling pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 23, p. 5370–5377, 2017.

LOIOLA, M. I. B. et al. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 473–487, 2007.

LÓPEZ et al. Non–Small Cell Lung Cancer. **Medicine (Spain)**, v. 13, n. 25, p. 1377–1387, 4 set. 2023.

LORIA, R. et al. Cross-Resistance Among Sequential Cancer Therapeutics: An Emerging Issue. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 877380, 23 jun. 2022.

LU, J. F.; POKHAREL, D.; BEBAWY, M. MRP1 and its role in anticancer drug resistance. <https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1105253>, v. 47, n. 4, p. 406–419, 2 out. 2015.

LUK, C. et al. Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 125, n. 2, p. 87–99, mar. 2001.

LUKEIS, R. et al. Cytogenetics of non-small cell lung cancer: analysis of consistent non-random abnormalities. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 2, n. 2, p. 116–124, 1990.

MALHOTRA, J. et al. Risk factors for lung cancer worldwide. **The European respiratory journal**, v. 48, n. 3, p. 889–902, 1 set. 2016.

MANSOORI, B. et al. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 3, p. 339, 2017.

MARIN, J. J. G.; MACIAS, R. I. R. Understanding drug resistance mechanisms in cholangiocarcinoma: assisting the clinical development of investigational drugs. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 30, n. 7, p. 675–679, 3 jul. 2021.

MARINHO, E. M. et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, n. November 2020, p. 1–6, 2020.

MATSUMOTO, M. et al. Cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer cells is dependent on Bax- and Bak-induction pathway and synergistically activated by BH3-

mimetic ABT-263 in p53 wild-type and mutant cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, n. 2, p. 490–496, 29 abr. 2016.

MCDERMOTT, M. et al. In vitro development of chemotherapy and targeted therapy drug-resistant cancer cell lines: A practical guide with case studies. **Frontiers in Oncology**, v. 4 MAR, p. 79768, 6 mar. 2014.

MI, Q. et al. Pervilleine A, a Novel Tropane Alkaloid that Reverses the Multidrug-resistance Phenotype. **Cancer Research**, v. 61, n. 10, 2001.

MI, Q. et al. Characterization of tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance phenotype. **Anticancer research**, v. 22, n. 3, p. 1385–97, 2002a.

MI, Q. et al. Pervilleines B and C, new tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance in the hollow fiber assay. **Cancer Letters**, v. 184, n. 1, p. 13–20, 8 out. 2002b.

MI, Q. et al. Pervilleine F, a New Tropane Alkaloid Aromatic Ester that Reverses Multidrug Resistance. **Anticancer Research**, v. 23, n. 5 A, p. 3607–3615, set. 2003.

MIN, H. Y.; LEE, H. Y. Cellular Dormancy in Cancer: Mechanisms and Potential Targeting Strategies. **Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association**, v. 55, n. 3, p. 720, 1 jul. 2023.

MIRZAYANS, R.; ANDRAIS, B.; MURRAY, D. Roles of Polyploid/Multinucleated Giant Cancer Cells in Metastasis and Disease Relapse Following Anticancer Treatment. **Cancers**, v. 10, n. 4, 15 abr. 2018.

MISONO, S. et al. Molecular Signature of Small Cell Lung Cancer after Treatment Failure: The MCM Complex as Therapeutic Target. **Cancers**, v. 13, n. 6, p. 1–16, 2 mar. 2021.

MO, Z. et al. GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. 1–15, 29 nov. 2013.

MORRIS, M. E.; ZHANG, S. Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. **Life sciences**, v. 78, n. 18, p. 2116–2130, 27 mar. 2006.

NARAYAN, R. S. et al. A cancer drug atlas enables synergistic targeting of independent drug vulnerabilities. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.

NCI. **What Is Cancer?** - NCI. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 18 jan. 2024.

NEYFAKH, A. A.; DMITREVSKAYA, T. V.; SERPINSKAYA, A. S. The membrane transport system responsible for multidrug resistance is operating in nonresistant cells. **Experimental cell research**, v. 178, n. 2, p. 513–517, 1988.

NEZHAD, N. G. et al. Recent advances in simultaneous thermostability-activity improvement of industrial enzymes through structure modification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 232, n. January, p. 123440, mar. 2023.

O'CONNOR, S. E. Alkaloids. **Comprehensive Natural Products II**, p. 977–1007, 1 jan. 2010.

OLAUSSEN, K. A.; POSTEL-VINAY, S. Predictors of chemotherapy efficacy in non-small-cell lung cancer: a challenging landscape. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 27, n. 11, p. 2004–2016, 1 nov. 2016.

ÖZERKAN, D. The Determination of Cisplatin and Luteolin Synergistic Effect on Colorectal Cancer Cell Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction by Fluorescence Labelling. **Journal of fluorescence**, v. 33, n. 3, p. 1217–1225, 1 maio 2023.

PARK, S. Y. et al. Characterization of chromosomal aberrations in lung cancer cell lines by cross-species color banding. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 124, n. 1, p. 62–70, 1 jan. 2001.

PEI, J. et al. Genomic imbalances in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 31, n. 3, p. 282–287, 2001.



POKU, V. O.; IRAM, S. H. A critical review on modulators of Multidrug Resistance Protein 1 in cancer cells. **PeerJ**, v. 10, 5 jan. 2022.

PV, K. et al. Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. **Oncology reports**, v. 23, n. 4, 4 mar. 2010.

RAMALHETE, C. et al. Triterpenoids from *Momordica balsamina* with a Collateral Sensitivity Effect for Tackling Multidrug Resistance in Cancer Cells. **Planta Medica**, v. 84, n. 18, p. 1372–1379, 11 jul. 2018.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, set. 2012.

RANASINGHE, R.; MATHAI, M. L.; ZULLI, A. Cisplatin for cancer therapy and overcoming chemoresistance. **Heliyon**, v. 8, n. 9, 1 set. 2022.

REN, L. et al. MDR1 and MDR3 genes and drug resistance to cisplatin of ovarian cancer cells. **Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science**, v. 27, n. 6, p. 721–724, 1 dez. 2007.

REN, Z. X. et al. Suitable parameter choice on quantitative morphology of A549 cell in epithelial-mesenchymal transition. **Bioscience reports**, v. 35, n. 3, p. 1–7, 2015.

RIBEIRO, I. P.; MELO, J. B.; CARREIRA, I. M. Cytogenetics and Cytogenomics Evaluation in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, 1 out. 2019.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols** 2006 1:3, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 9 nov. 2006.

RIEHM, H.; BIEDLER, J. L. Cellular Resistance To Daunomycin In Chinese Hamster Cells In Vitro 1. **Cancer Research**, v. 31, n. 4, p. 409–412, 1971.

ROGAN, A. M. et al. Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. **Science**, v. 224, n. 4652, p. 994–996, 1984.

ROSENBERG, B. Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. **Die Naturwissenschaften**, v. 60, n. 9, p. 399–406, set. 1973.

ROSENBERG, M. F. et al. The Structure of the Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1): CRYSTALLIZATION AND SINGLE-PARTICLE ANALYSIS \*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 16076–16082, 11 maio 2001.

SALENTIN, S. et al. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W443–W447, 1 jul. 2015.

SAVARAJ, N. et al. Multidrug-resistant gene expression in small-cell lung cancer. **American journal of clinical oncology**, v. 20, n. 4, p. 398–403, ago. 1997.

SECLÌ, L. et al. Personalized Cancer Vaccines Go Viral: Viral Vectors in the Era of Personalized Immunotherapy of Cancer. **International Journal of Molecular Sciences** **2023**, Vol. 24, Page 16591, v. 24, n. 23, p. 16591, 22 nov. 2023.

SHEN, W. et al. Epithelial-mesenchymal transition contributes to docetaxel resistance in human non-small cell lung cancer. **Oncology research**, v. 22, n. 1, p. 47–55, 2014.

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 23–36, 2014.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7265–7279, 20 out. 2003a.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7265–7279, 20 out. 2003b.

SIEGEL, R. L.; GIAQUINTO, A. N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2024. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 1, p. 12–49, jan. 2024.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, 8 jan. 2019.

SILVA, J. et al. Evaluation of the ADME, toxicological analysis and molecular docking studies of the anacardic acid derivatives with potential antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Analytical & Pharmaceutical research**, v. 10, n. 5, p. 177–194, 2021.

STRUSKI, S. et al. Identification of chromosomal loci associated with non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to topoisomerase II inhibitor in lung adenocarcinoma cell line by comparative genomic hybridization. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 30, n. 2, p. 136–142, 1 fev. 2001.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

SUPEK, F. et al. Could LogP be a principal determinant of biological activity in 18-crown-6 ethers? Synthesis of biologically active adamantane-substituted diaza-crowns. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3444–3454, ago. 2011.

SYED, S. B. et al. Targeting P-glycoprotein: Investigation of piperine analogs for overcoming drug resistance in cancer. **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–18, 11 ago. 2017.

TAKAHASHI, K. et al. Establishment of a 5-fluorouracil-resistant triple-negative breast cancer cell line. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 6, p. 1985–1991, 1 dez. 2013.

THIESSEN, I. M.; AEBISHER, D.; BARTUSIK-AEBISHER, D. Atropine. **The Biochemical Guide to Toxins**, p. 15–18, 23 jun. 2023.

TIPPETT, V. L. et al. The strategy and clinical relevance of in vitro models of MAP resistance in osteosarcoma: a systematic review. **Oncogene** **2022** **42:4**, v. 42, n. 4, p. 259–277, 25 nov. 2022.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–61, 30 jan. 2010.

TSUBAKI, M. et al. By inhibiting Src, verapamil and dasatinib overcome multidrug resistance via increased expression of Bim and decreased expressions of MDR1 and survivin in human multidrug-resistant myeloma cells. **Leukemia Research**, v. 38, n. 1, p. 121–130, 1 jan. 2014a.

TSUBAKI, M. et al. By inhibiting Src, verapamil and dasatinib overcome multidrug resistance via increased expression of Bim and decreased expressions of MDR1 and survivin in human multidrug-resistant myeloma cells. **Leukemia Research**, v. 38, n. 1, p. 121–130, 1 jan. 2014b.

WANG, J. et al. Expression of P-gp, MRP, LRP, GST- $\pi$  and TopoII $\alpha$  and intrinsic resistance in human lung cancer cell lines. **Oncology Reports**, v. 26, n. 5, p. 1081–1089, nov. 2011.

WHO, I. **The Global Cancer Observatory**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>>. Acesso em: 6 set. 2023.

WIESE, M.; STEFAN, S. M. **The A-B-C of small-molecule ABC transport protein modulators: From inhibition to activation—a case study of multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1)**. **Medicinal Research Reviews** John Wiley and Sons Inc., , 1 nov. 2019.

WONG, B. S. et al. Anticancer Effects of Antihypertensive L-Type Calcium Channel Blockers on Chemoresistant Lung Cancer Cells via Autophagy and Apoptosis. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 1913, 2020.

WU, F. et al. ULTRASOUND REVERSES MULTIDRUG RESISTANCE IN HUMAN CANCER CELLS BY ALTERING GENE EXPRESSION OF ABC TRANSPORTER PROTEINS AND BAX PROTEIN. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 37, p. 151–159, 2011.

XIAO, H. et al. Clinically-Relevant ABC Transporter for Anti-Cancer Drug Resistance. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 648407, 19 abr. 2021.

XIN, M. et al. Autophagy Inhibition Enhances the Anti-Tumor Activity of Methylseleninic Acid in Cisplatin-Resistance Human Lung Adenocarcinoma Cells. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, 3 maio 2022.

YAN, J. et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by luteolin: kinetics, interaction and molecular docking. **International journal of biological macromolecules**, v. 64, n. March 2014, p. 213–23, mar. 2014.

YANG, C. H. et al. Gefitinib Reverses Chemotherapy Resistance in Gefitinib-Insensitive Multidrug Resistant Cancer Cells Expressing ATP-Binding Cassette Family Protein. **Cancer Research**, v. 65, n. 15, p. 6943–6949, 1 ago. 2005.

YODSOI KANINTRONKUL, R. W. N. T. Overcoming multidrug resistance in human lung cancer with novel benzo[a]quinolizin-4-ones - PubMed. 2011.

YUSUF, D. et al. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 1 jul. 2008.

ZAHREDDINE, H.; BORDEN, K. L. B. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4 MAR, p. 28, 14 mar. 2013.

ZENG, F. et al. Rociletinib (CO-1686) enhanced the efficacy of chemotherapeutic agents in ABCG2-overexpressing cancer cells in vitro and in vivo. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 5, p. 799–811, 1 maio 2020.

ZHANG, Q. et al. Apatinib Reverses Paclitaxel-resistant Lung Cancer Cells (A549) Through Blocking the Function of ABCB1 Transporter. **Anticancer research**, v. 39, n. 10, p. 5461–5471, 2019.

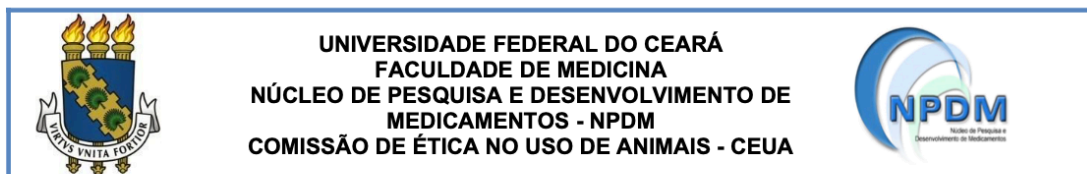
ZHANG, Y. et al. Tetramethylpyrazine reverses multidrug resistance in breast cancer cells through regulating the expression and function of P-glycoprotein. **Medical oncology (Northwood, London, England)**, v. 29, n. 2, p. 534–538, jun. 2012.

ZHANG, Y. et al. Antitumor Research on Artemisinin and Its Bioactive Derivatives. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 8, n. 4, p. 303–319, 2018.

ZHANG, Y. K. et al. Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy. **The AAPS Journal**, v. 17, n. 4, p. 802, 24 jul. 2015.

ZULLO, L. et al. Molecular and Genetic Advances in Small Cell Lung Cancer Landscape: From Homogeneity to Diversity. **International Journal of Molecular Sciences 2024, Vol. 25, Page 224**, v. 25, n. 1, p. 224, 22 dez. 2023.

## ANEXO A



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**AValiação da Atividade Hemolítica dos Derivados Quinolônicos: ENSJ5, ENSJ32 e RCDFC; dos Derivados de Alcaloides Tropanos EB-PA e EB-PB, da Lassbio1920, Pterocarpano e LQB 507, em Modelo Ex Vivo de Eritrócitos de Camundongos Swiss (Mus Musculus)**” registrada com o protocolo **41111022-0**, sob a responsabilidade **Manoel Odorico de Moraes Filho e Eleicy Nathaly Mendoza Hernandez** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 20 / 10 / 2022.

We hereby certify that the project entitled “**EVALUATION OF THE HEMOLYTIC ACTIVITY OF QUINOLONE DERIVATIVES: ENSJ5, ENSJ32 AND RCDFC; OF TROPANE ALKALOID DERIVATIVES EB-PA AND EB-PB, LASSBIO1920, PTEROCARPANE AND LQB 507, IN A SWISS MOUSE ERYTHROCYTE MODEL EX VIVO (MUS MUSCULUS)**” identified by the protocol number **41111022-0**, and conducted **Manoel Odorico de Moraes Filho e Eleicy Nathaly Mendoza Hernandez** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 10 / 20 / 2022.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: OUTUBRO/2022 Fim: ABRIL/2023
Espécie	Camundongo heterogêneo
Linhagem	Swiss
Nº de animais autorizados	9
Peso	25 a 30 gramas
Idade	63 dias
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 11 de novembro de 2022

Documento assinado digitalmente  
 LAIS LACERDA BRASIL DE OLIVEIRA  
 Data: 11/11/2022 07:49:21-0300  
 Verifique em <https://verificador.itl.br>

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais  
 Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos  
 Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275 - Tel: 55 (85) 3366-8338  
 Horário de atendimento: Segunda a Sexta, das 9h às 12h e das 13h30 às 18h. E-mail: ceua-npdm@ufc.br

## ANEXO B

### 1. MATERIAIS E REAGENTES PARA WESTERN BLOT

#### A) TAMPÃO DE LAVAGEM WESTERN BLOT (TBS)

##### 1000mL de TBS 10X

Reagentes	Quantidade
Tris base	24,2 g
NaCl	88 g
dH <sub>2</sub> O	1000
Ajuste o pH para 7,6 com HCL 1N	

\*Armazenar na geladeira

##### 1000mL de TBS-T

Reagentes	Quantidade	[ ] Final
TBS 10 x	100 mL	10 mM
dH <sub>2</sub> O	900mL	0.9% (w/v)
Tween 20 (10% v/v)	2mL	0.02% (v/v)

#### B) ANTICORPO PRIMARIO EM LEITE 2%

Reagentes	Quantidade
Anticorpo primario (1:1000)**	10 µL
Leite em pó	0.2 g
H <sub>2</sub> Odd	Para um volume final de 10mL*

\*Dissolver bem para não deixar grumos de leite

\*\*depende do anticorpo a concentração

#### C) SOLUCAO DE BLOQUEIO DE LEITE PRIMÁRIO DE 2%\*

Reagentes	Quantidade
Leite em pó	1,0 g
TBST 1X	Para um volume final de 50mL*

\*Dissolver bem para não deixar grumos de leite

#### D) PONCEAU S STAIN

Reagentes	Quantidade
Ponceau S	0,10 g
Ácido acético	5 mL
H <sub>2</sub> Odd	Para diluir em 100 mL

Obs : utilizado após a transferência das proteínas na membrana por 1 hora, para retirar a coloração lavar com água destilada sub-agitação

#### E) BUFFER DE TRANSFERENCIA 10X EM SEMI SECO ou SEMY DRY



**1000mL buffer de transferência 10X em semi seco**

Reagentes	Quantidade	10x Conc.
Tris base	121.1g	1M
Glycine	14.4g	1.92M
SDS	1g	0.10%
dH2O	diluir para 1L volume final *	

OBS >PH: 8.3 SDS: dodecilsulfato de sódio\* Armazenar na geladeira

**1000mL buffer de transferencia 1X em semi seco**

Reagentes	Quantidade
10X buffer de transferência	100mL
Metanol	200mL
dH2O	Diluir para 1L Volume final

**F) BUFFER DE ELECTROFORESE TGS 10X****1000mL de tampão de eletroforese TGS 10X**

Reagentes	Quantidade
Tris base	30,285 g (250mM)
Glicina	144,13 (1920mM)
SDS	10 g (1%)
dH2O	Diluir para 1L Volume final *

\*Armazenar na geladeira, pH: 8.3

**G) BUFFER DE ELECTROFORESE TGS 1X****1000mL de tampão de eletroforese TGS 1X**

Reagentes	Quantidade	[ ] Final
TGS 10X	100 ml	1X
dH2O	Diluir para 1L Volume final	

\*TGS(Tris-glycine-SDS)

**H) TAMPAO DE AMOSTRA Laemmli 4X**

Reagentes	Quantidade	10X Concentração
TRIS-HCL pH 6.5	1.5 mL	1 M
DTT	3 mL	1 M
SDS	0.6 g	
Azul de bromofenol	30 mg	
Glicerol	2.4 mL	
H2Omq	Diluir para 7.5 mL final volume	

OBS> dependendo do tamanho molecular das proteínas (>200kDa) e recomendável

Utilizar B-mercaptop 0.8ml para cada 100 ml na amostra final.

**I) ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA 30%**

<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Concentração</b>
Acrilamida	29g	29w/v
Bis-acrilamida	1 g	1w/v
H <sub>2</sub> O	Diluir para 100 $\mu$ L Volume final	

\*Filtrar solução com filtro de seringa 0.45 $\mu$ m . \*pH=7 ou < 7, armazenar geladeira 4-8 °C