

MESTRADO EM CIÊNCIAS FORENSES
CIÊNCIAS LABORATORIAIS FORENSES

“Screening” de novos moduladores da glicoproteína P: aplicações na Toxicologia Clínica e Forense

Bárbara Antónia da Silva Cruz

M

2019



SEDE ADMINISTRATIVA

FACULDADE DE MEDICINA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

FACULDADE DE DIREITO

FACULDADE DE FARMÁCIA

FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

FACULDADE DE PSICOLOGIA E DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR



Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em ciências forenses, realizada sob a orientação da professora doutora Renata Silva (FFUP); do professor doutor Fernando Remião (FFUP).

Agradecimentos:

Comecei este ano a pensar que seria fácil conciliar o trabalho e a dissertação. Com o passar do tempo, apercebi-me que esta tarefa seria muito mais desafiante do que eu antecipei. Como tal, tentei dar o máximo de mim em ambas, e só consegui chegar ao fim deste árduo ano com todos os meus objetivos concluídos graças a todas as pessoas que me acompanharam ao longo desta longa caminhada.

Antes de mais, queria agradecer de coração à minha grande orientadora Renata Silva por todo o apoio, segurança e ajuda. Sei que tudo o que disse foi com o intuito de me tornar mais e melhor e vou ser-lhe eternamente grata por isso. Você foi muito mais que uma orientadora, foi uma companheira, acompanhou-me a cada minuto desta caminhada e esteve sempre disponível para ajudar, solucionar problemas que foram surgindo, a qualquer hora do dia e a qualquer dia da semana e nunca esquecerei isso. Muito obrigado pela paciência que teve comigo, eu sei que por vezes é complicado lidar com uma pessoa tão esquecida quanto eu.

Ao meu coorientador Fernando Remião agradeço toda a ajuda, paciência, conselhos e incentivos que deu ao longo do processo de escrita. Assim como todas aquelas reuniões que tanto insistiu que fossem realizadas de forma a haver metas semanais. Graças a isso, consegui ir organizando ao longo do ano toda a informação que necessitava para escrever esta dissertação, organizar ideias para a construir e ter uma ideia de onde me situava na parte experimental. Muito obrigada.

Gostaria de agradecer também à Bárbara Silva, a pessoa que me recebeu de mãos abertas no laboratório e me ensinou aquilo que sabia sobre cultura celular, todos os cuidados que são necessários ter e que também me ajudou sempre que precisei ao longo do ano. Ao Carlos Fernandes, à Eva Martins e à Vera Silva, que estiveram ao meu lado no laboratório grande parte do ano e foram uma ajuda imprescindível. Sem eles eu não conseguiria ter chegado onde cheguei, muito obrigado mesmo.

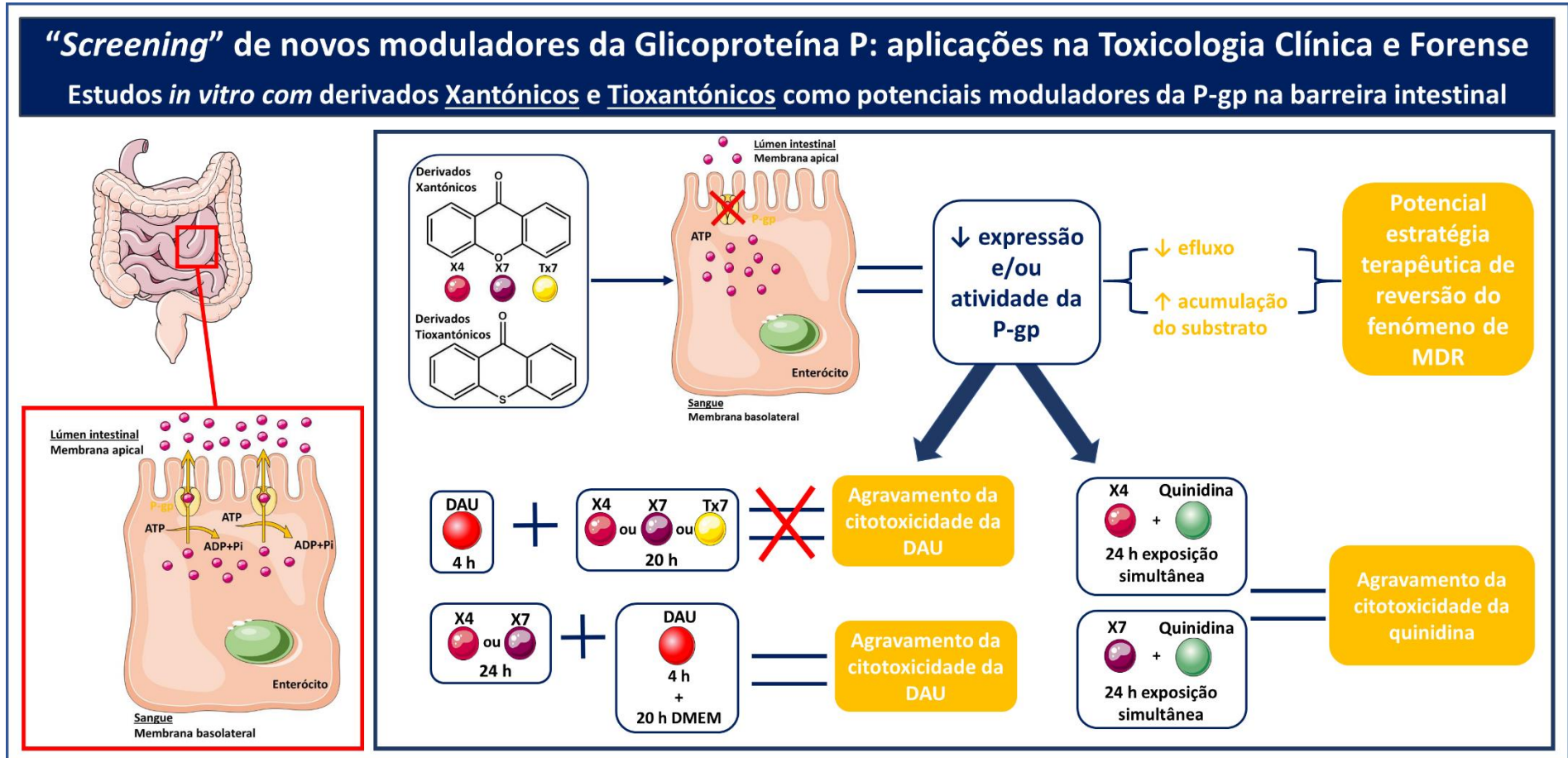
Às técnicas do Laboratório de Toxicologia, Cátia Faria e Margarida Silva obrigada por toda a ajuda e paciência que me deram, especialmente no início, em que eu não sabia o nome de nada e vocês conseguiam decifrar a minha linguagem incrivelmente imaginativa para descrever objetos cujos não sabia o nome. Muito obrigada por toda a ajuda.

À minha família extremamente invulgar, apesar de estarmos muito longe fisicamente estamos muito perto no coração. Ao meu pai, que me estava sempre a chatear para eu fazer as coisas mais depressa, apesar de estares sempre a brincar, eu sei que tu nunca duvidaste que eu seria capaz de chegar onde cheguei, e por isso muito obrigada. Ao meu irmão por alimentar esta relação de amor e ódio que sempre tivemos, mas que nos manteve sempre motivados a atingir os nossos objetivos e a saber que estamos sempre aqui um para o outro. À minha madrinha, Marília por todo o apoio incondicional que me deu ao longo deste processo, confiando a 100% que eu seria capaz de acabar com sucesso esta etapa, pelas tardes em que adormeci no sofá ao fim de semana de exaustão e tu ainda me incentivavas a continuar, muito obrigado. À minha madrinha Belinha por tudo o que fez por mim, por todo o apoio e confiança que depositou em mim, não tiveste desde o início na minha vida, mas no tempo que tiveste foste sempre incansável, muito obrigado por isso.

À minha segunda família que são os meus amigos da famosa RUF. Cris, Lei, Marco, Lídio, Simão, Cátia, Margarida e Carol, meninos do meu coração, obrigada por tudo, por me terem dado os melhores dois anos da minha vida, por todo o apoio ao longo destes dois anos, pela motivação que me davam todos os dias, pelos raspanetes que ouvi por não dormir a horas decentes e não comer às horas que devia. Vocês sempre tiveram aqui para mim e eu nunca vou esquecer isso, porque aliás família não se esquece. Ao Fábio, seu tonto, por toda a paciência que tiveste comigo, especialmente este ano, obrigado do fundo do coração pelo apoio incondicional, ajuda e acima de tudo por teres estado desde o início do meu lado neste percurso. Obrigada por todos os dias que esperaste por mim para jantar, ou em que eu chegava a casa e tinha comida feita para comer. Foste um santo por aguentar tudo e teres-te mantido sempre a meu lado, a dar-me motivação para seguir em frente e a acreditares sempre que eu chegaria ao fim com sucesso. Muito obrigado mesmo, nunca me vou esquecer de tudo o que fizeste por mim.

E a todas as outras pessoas que não referi, mas sabem que tiveram um papel importante em todo este percurso, muito obrigada.

Resumo Gráfico



Abstract

P Glycoprotein (P-gp) is an efflux pump that belongs to the ABC transporters superfamily and which is present in the plasmatic membrane. Being highly expressed in barrier and excretory organs/tissues, such as liver, intestine, kidneys, and blood-brain barrier (BBB), it performs an important role in the organism, namely in the excretion of endobiotics and xenobiotics, protecting the cells against their toxicity. Since P-gp has a high variety of substrates, this protein is important at a forensic and clinical level, by promoting the efflux of compounds like anticancer drugs, antidepressants, antipsychotics, analgesics, among others. For this reason, P-gp is associated with the development of multidrug resistance (MDR) and therapeutic failure. Therefore, P-gp modulation (induction, activation, inhibition) can be an important therapeutic strategy. P-gp inducers and/or activators will promote an increase in P-gp expression and/or activity and, consequently, will increase the excretion of its substrates, which is an important mechanism both in reducing the development of neurodegenerative disease (ex: Alzheimer disease, where occurs the accumulation of β -amyloid peptide, a P-gp substrate) and in cases of overdose with its substrates. On the other hand, P-gp inhibitors will reduce the transporter activity and, consequently, decrease the excretion and increase the intracellular accumulation of drugs used in therapy that are P-gp substrates, an essential mechanism for the reversal of the MDR phenomenon.

The present study aims to evaluate the potential effect of five newly synthesized xanthonic derivatives (X1 to X5) and ten newly synthesized tioxanthonic derivatives (Tx1 to Tx10) in P-gp expression and/or activity, in Caco-2 cells, which mimic the characteristics of the enterocytes present at the human small intestine. Then, the most promising compounds were evaluated for their ability to change the cytotoxicity of quinidine and daunorubicin (DAU), two P-gp substrates.

The cytotoxicity of the tested compounds was evaluated by the neutral red (NR) uptake, MTT reduction, resazurin (REZ) reduction and sulforhodamine B (SRB) binding assay, 24 h after exposure to the xanthonic (0 - 20 μ M) and tioxanthonic (0 - 50 μ M) derivatives, in order to select non-cytotoxic concentrations to be used in subsequent assays. A concentration of 20 μ M was selected based on previous results,

Abstract

as well as based on the obtained results, given their non-cytotoxic effects in Caco-2 cells at this concentration.

After exposure of Caco-2 cells to the xanthonic and tioxanthonic derivatives (20 μM) during the 90 minutes incubation with rhodamine 123 (RHO 123, 10 μM), the compounds X1, Tx1 and Tx10 immediately increased P-gp activity, showing their ability as P-gp activators. Contrarily, X7, Tx7, Tx8 and Tx9 significantly reduced P-gp activity, acting as potential P-gp inhibitors.

After the evaluation of the effects of xanthonic and tioxanthonic derivatives in P-gp expression (after a 24 h exposure), by flow cytometry using the antibody UIC2-PE, X4 and Tx1 revealed the ability to significantly decrease the cell surface protein expression. However, only for X4 a correlation between P-gp activity and expression (decrease in P-gp expression translated into a decrease in P-gp activity) was observed. Although a significantly decrease in P-gp activity was detected after a 24 h exposure to X7, it is more likely that this effect results from a direct P-gp inhibition rather than a decreased P-gp expression. Therefore, this study highlights the need for a simultaneous evaluation of P-gp expression and activity when assessing potential P-gp inducers, activators and inhibitors.

Due to their inhibitory effects on P-gp activity and/or expression, X4, X7 and Tx7 were also tested for their ability to increase the cytotoxicity of DAU, a P-gp substrate, under two different experimental protocols: 1) exposure to DAU (4 h) followed by its removal and incubation with the selected compounds (20 h); 2) pre-incubation with the selected compounds (24 h) followed by their removal and exposure to DAU (4 h). In the first assay, there were no significant differences in the substrate cytotoxicity. However, the pre-exposure of Caco-2 cells to X4 and X7 for 24 h resulted in a significant increase in DAU cytotoxicity for the 5, 10 and 25 μM concentrations. In the evaluation study of the compounds effects on quinidine cytotoxicity, it was demonstrated that simultaneous exposure to X4 caused a significant increase in quinidine cytotoxicity for the 100, 150 and 200 μM concentrations, while for X7 this effect was only significant for the highest concentration tested (200 μM).

In conclusion, the results obtained in the scope of this dissertation highlight the ability of X4 and X7 as P-gp inhibitors, resulting in a significant increase in the cytotoxicity of two P-gp substrates. Because of the highest potency demonstrated, X4 represents a putative P-gp inhibitor that could be used in cases of MDR development, promoting the accumulation of drugs that are P-gp substrates at the target organs/tissues, increasing their therapeutic efficiency.

Keywords: Glycoprotein P; Induction; Inhibition; Activation; Resistance; Therapeutic efficiency;

Resumo

A glicoproteína P (P-gp) é uma bomba de efluxo pertencente à superfamília de transportadores ABC, que está presente na membrana plasmática. Sendo mais expressa em órgãos/tecidos barreira e excretórios, como intestino, rins, fígado, barreira hematoencefálica (BHE), desempenha um papel essencial no organismo, nomeadamente na excreção de endobióticos e xenobióticos, protegendo, assim, as células contra a citotoxicidade dos mesmos. O seu vasto leque de substratos torna esta proteína relevante quer a nível clínico como forense, ao promover o efluxo de compostos anticancerígenos, antidepressivos, antipsicóticos, analgésicos, entre outros. Por este motivo, está associada ao desenvolvimento do fenómeno de resistência a multifármacos (MDR) e, conseqüentemente, a casos de ineficácia terapêutica. Deste modo, a modulação (indução, ativação, inibição) desta proteína pode representar uma importante estratégia a nível terapêutico. Compostos indutores e/ou ativadores da P-gp vão promover o aumento da expressão e/ou atividade da P-gp e, conseqüentemente, aumentar a excreção dos seus substratos, mecanismo essencial na redução do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (ex: doença de Alzheimer em que ocorre acumulação do peptídeo β -amilóide, um substrato da P-gp) e em casos de sobredosagem com os seus substratos. Por outro lado, compostos inibidores da P-gp vão promover a diminuição da atividade da proteína e, conseqüentemente, reduzir a excreção e aumentar a acumulação intracelular de fármacos usados na terapêutica que são substratos deste transportador, mecanismo essencial para a reversão do fenómeno de MDR.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial efeito de 5 novos derivados xantônicos (X1 a X5) e de 10 novos derivados tioxantônicos (Tx1 a Tx10) na atividade e/ou expressão da P-gp, em células Caco-2, as quais mimetizam as características dos enterócitos do intestino delgado humano. Posteriormente, foi avaliada a capacidade dos compostos mais promissores para influenciar a citotoxicidade de substratos da P-gp, nomeadamente a quinidina e a daunorrubicina (DAU).

A citotoxicidade dos compostos em estudo foi analisada pelos ensaios de incorporação do vermelho neutro (NR), de redução do MTT, de redução da resazurina

(REZ) e de ligação da sulforodamina B (SRB), 24 h após a exposição aos derivados xantônicos (0 - 20 μ M) e aos derivados tioxantônicos (0 - 50 μ M), de modo a selecionar concentrações não citotóxicas para os ensaios subsequentes. Com base nos resultados obtidos, e em estudos prévios, foi selecionada a concentração de 20 μ M, dada a ausência de efeitos citotóxicos nas células Caco-2.

Após a exposição das células Caco-2 aos derivados xantônicos e tioxantônicos (20 μ M) durante os 90 minutos de incubação com rodamina 123 (RHO 123, 10 μ M), os compostos X1, Tx1 e Tx10 aumentaram de forma direta e imediata a atividade da proteína, demonstrando ser ativadores da P-gp. Pelo contrário, os compostos X7, Tx7, Tx8, Tx9 reduziram significativamente a atividade da P-gp demonstrando ser potenciais inibidores da proteína.

No estudo dos efeitos dos derivados xantônicos e tioxantônicos na expressão da P-gp (após 24 h exposição e por citometria de fluxo usando o anticorpo UIC2-PE) os compostos X4 e Tx1 demonstraram a capacidade para reduzir significativamente a expressão da proteína. No entanto, apenas para o composto X4 se verificou uma correlação entre a atividade e expressão da P-gp (redução da expressão traduzida na redução da atividade). Apesar da observação de uma redução significativa da atividade da P-gp 24 h após exposição ao X7, esta não resultou de uma diminuição da sua expressão, mas, provavelmente, da inibição direta da proteína. Estes resultados demonstram a necessidade do estudo simultâneo da atividade e expressão da P-gp, aquando da avaliação de potenciais indutores, ativadores e inibidores.

Devido aos seus efeitos inibitórios na atividade e/ou expressão da P-gp, os compostos X4, X7 e Tx7 foram testados quanto à sua capacidade de agravar a citotoxicidade de um substrato da P-gp, a DAU, usando dois protocolos experimentais distintos: 1) exposição à DAU (4 h) seguida da sua remoção e incubação com os compostos em estudo (20 h); 2) pré-exposição aos compostos em estudo (24 h), seguido da sua remoção e exposição à DAU (4 h). No primeiro caso, verificou-se a ausência de efeitos significativos na citotoxicidade do substrato. No entanto, com a pré-exposição aos compostos X4 e X7 durante 24 h, verificou-se um aumento significativo da citotoxicidade da DAU para as concentrações de 5, 10 e 25 μ M. No ensaio de avaliação dos efeitos dos compostos na citotoxicidade da quinidina,

verificou-se que a exposição simultânea a X4 resultou num aumento significativo da citotoxicidade da quinidina para as concentrações de 100, 150 e 200 μM , enquanto que para o derivado X7 esse efeito foi apenas significativo para a concentração mais elevada (200 μM).

Concluindo, os resultados obtidos nesta dissertação demonstram o potencial inibidor da P-gp dos compostos X4 e X7, resultando num aumento significativo da citotoxicidade de dois substratos da proteína. Pela maior potência demonstrada, o composto X4 representa um possível inibidor da P-gp, potencialmente útil em casos de desenvolvimento de MDR, promovendo a acumulação de fármacos substratos da P-gp nos órgãos/tecidos alvo, aumentando, assim, a eficácia terapêutica dos mesmos.

Palavras-chave: Glicoproteína P; Indução; Inibição; Ativação; Resistência; Eficácia terapêutica;

Índice

Resumo Gráfico	vii
Abstract	ix
Resumo	xiii
Índice	xvii
Índice de Figuras	xxi
Índice de Tabelas.....	xxv
Lista de abreviaturas	xxvii
1. Introdução.....	3
1.1. Transporte membranar e Transportadores Membranares.....	3
1.2. Glicoproteína P (P-gp)	8
1.2.1. Estrutura da P-gp	9
1.2.2. Localização e função fisiológica da P-gp.....	10
1.2.3. Polimorfismos do gene <i>ABCB1</i>	15
1.2.3.1. Principais polimorfismos	15
1.2.4. Substratos da P-gp	16
1.2.5. Papel da P-gp no fenómeno de resistência a multifármacos (MDR).....	19
1.2.6. Papel da P-gp no desenvolvimento/progressão de doenças - Relevância no SNC	22
1.2.7. Modulação da P-gp	24
1.2.7.1. Inibição	25
1.2.7.1.1. Principais inibidores.....	25

1.2.7.1.2.	Mecanismos de inibição	26
1.2.7.2.	Indução	27
1.2.7.2.1.	Principais indutores	27
1.2.7.2.2.	Mecanismos de indução	28
1.2.7.3.	Ativação	28
1.2.7.3.1.	Principais ativadores	28
1.2.7.3.2.	Mecanismos de ativação	29
1.2.7.4.	Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	30
1.2.7.4.1.	Inibição.....	30
1.2.7.4.2.	Indução e Ativação.....	30
1.2.7.4.2.1.	Indutores e Ativadores como potenciais vias antidotais	34
1.2.7.5.	Importância da modulação da P-gp na BHE	35
1.2.7.6.	Importância da modulação da P-gp na barreira intestinal.....	37
1.2.8.	A P-gp e as suas Implicações Forenses	38
1.2.8.1.	P-gp e antidepressivos.....	40
1.2.8.2.	P-gp e opioides.....	42
1.3.	Xantonas e Tioxantonas como potenciais moduladores da P-gp.....	45
2.	Objetivos do Trabalho	51
3.	Materiais e Métodos	55
3.1.	Materiais	55
3.2.	Xantonas e Tioxantonas	55
3.3.	Cultura Celular	56
3.3.1.	Modelo celular: células Caco-2.....	56

3.3.2.	Tripsinização e Sementeira	57
3.4.	Citotoxicidade das Xantonas e das Tioxantonas:	60
3.4.1.	Ensaio de Incorporação do Vermelho Neutro (Neutral red, NR)	60
3.4.2.	Ensaio de Redução do MTT	61
3.4.3.	Ensaio de Redução da Resazorina (REZ).....	63
3.4.4.	Ensaio de ligação da Sulforodamina (SRB)	64
3.5.	Estudo da Modulação da P-gp:	65
3.5.1.	Ensaio de acumulação da RHO 123 na presença dos derivados xantônicos e tioxantônicos - Ensaio de Ativação.....	66
3.5.2.	Ensaio de acumulação de RHO 123 em células pré-expostas aos derivados xantônicos e tioxantônicos durante 24 horas - Ensaio de Atividade 24 h	68
3.5.3.	Ensaio de avaliação da expressão da P-gp	70
3.6.	Avaliação do efeito dos compostos na citotoxicidade de substratos da P-gp .	72
3.6.1.	Avaliação do efeito dos compostos na citotoxicidade da Daunorrubicina...	73
3.6.2.	Avaliação da citotoxicidade da Quinidina na presença ou ausência dos compostos em estudo	77
3.7.	Análise estatística	79
4.	Resultados e Discussão	83
4.1.	Citotoxicidade dos derivados (Tio)xantônicos	83
4.1.1.	Citotoxicidade dos derivados Xantônicos	83
4.2.	Efeito dos derivados (Tio)xantônicos na expressão e atividade da P-gp	100
4.2.1.	Estudo da autofluorescência dos derivados (tio)xantônicos.....	100
4.2.2.	Efeito modulador da P-gp dos derivados Xantônicos	105
4.2.3.	Efeito modulador da P-gp dos derivados Tioxantônicos	110

Índice

4.3. Efeito dos derivados (Tio)Xantônicos na citotoxicidade de substratos da P-gp...	115
.....	
4.3.1. Efeito dos derivados (Tio)xantônicos na citotoxicidade da Daunorrubicina	117
4.3.2. Efeito dos derivados xantônicos X4 e X7 na citotoxicidade da quinidina ..	124
5. Conclusão.....	129
6. Referências:.....	131

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura topológica da P-gp. Adaptado de (Gameiro et al., 2017).....	10
Figura 2. Localização da P-gp nos enterócitos, hepatócitos, células proximais renais e células endoteliais da barreira hematoencefálica.	11
Figura 3. O fenómeno de resistência a multifármacos ao nível da barreira hematoencefálica (BHE) e a P-gp.	20
Figura 4. Representação gráfica da inibição, indução e ativação da P-gp, onde ocorre a redução da atividade, aumento da expressão e aumento da atividade da P-gp, respetivamente.....	24
Figura 5: Estrutura química do esqueleto das Xantonas.....	46
Figura 6: Estrutura química do esqueleto das Tioxantonas	47
Figura 7: Estrutura química base dos derivados Xantónicos (Xs) testados no presente estudo.	56
Figura 8: Estrutura química base dos derivados Tioxantónicos (Txs) testados no presente estudo.	56
Figura 9: Esquema representativo do processo de tripsinização realizado quando as células se encontravam a 80-90 % de confluência.....	57
Figura 10. Esquema representativo da sementeira celular após a contagem das células.....	59
Figura 11. Esquema representativo Esquema da exposição da placa de 24 poços, no ensaio de ativação.....	67
Figura 12. Esquema representativo da exposição e posterior tratamento das placas no ensaio de atividade após pré-exposição aos compostos durante 24 h.....	69
Figura 13. Esquema representativo da exposição aos compostos (20 µM) durante 24 h para a avaliação do seu efeito na expressão da P-gp.....	70

Figura 14. Esquema de exposição ao substrato (DAU) durante 4 h, seguido da sua remoção e adição de meio de cultura ou inibidor (ZOS, 5 μ M) ou compostos (20 μ M) em estudo (Protocolo experimental 1).	74
Figura 15. Esquema da pré-exposição aos compostos em estudo (X4 e X7, 20 μ M) ou inibidor (ZOS, 5 μ M), seguida da exposição ao substrato (DAU, 0-50 μ M) durante 4 h (Protocolo experimental 2).	75
Figura 16. Esquema de exposição das células Caco-2 para avaliação do efeito dos compostos na citotoxicidade da quinidina.....	77
Figura 17. Citotoxicidade dos derivados xantônicos (0 - 50 μ M) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro (NR), 24 h após a exposição.....	84
Figura 18. Avaliação da absorvância, a 540 nm, das células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados xantônicos (50 μ M).	85
Figura 19. Citotoxicidade dos derivados xantônicos (0 - 50 μ M) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de redução do MTT, 24 h após a exposição.....	86
Figura 20. Avaliação da absorvância, a 550 nm, das células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados xantônicos (50 μ M).	87
Figura 21. Citotoxicidade dos derivados xantônicos (0 - 50 μ M) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de redução da Resazurina, 24 h após a exposição.	88
Figura 22. Avaliação da fluorescência das células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados xantônicos (50 μ M) (comprimentos de onda de excitação/emissão de 560/590 nm, respetivamente).	89
Figura 23. Citotoxicidade dos derivados xantônicos (0 - 50 μ M) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio da Sulforodamina B, 24 h após a exposição.	90
Figura 24. Citotoxicidade dos derivados tioxantônicos (0 - 20 μ M) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro (NR), 24 h após a exposição.....	92
Figura 25. Avaliação da absorvância, a 540 nm, das células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados tioxantônicos (20 μ M).	93

Figura 26. Citotoxicidade dos derivados tioxantônicos (0 - 20 μ M) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de redução do MTT, 24 h após a exposição.....	94
Figura 27. Avaliação da absorvância, a 550 nm, das células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados tioxantônicos (20 μ M).....	95
Figura 28. Citotoxicidade dos derivados tioxantônicos (0 - 20 μ M) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de redução da Resazurina, 24 h após a exposição.	96
Figura 29. Avaliação da fluorescência das células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados tioxantônicos (20 μ M) (comprimentos de onda de excitação/emissão de 560/590 nm, respectivamente).	97
Figura 30. Citotoxicidade dos derivados tioxantônicos (0 - 20 μ M) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio da Sulforodamina B, 24 h após a exposição.	98
Figura 31. Histogramas representativos da análise, por citometria de fluxo, da autofluorescência de células Caco-2 no filtro de 530 ± 15 nm (detector FL1), 24 h após incubação com os derivados xantônicos (20 μ M)..	101
Figura 32. Avaliação da fluorescência das células Caco-2 expostas aos derivados xantônicos (20 μ M) durante 24 h, avaliada por espectrometria de fluorescência.....	101
Figura 33. Histogramas representativos da análise, por citometria de fluxo, da autofluorescência de células Caco-2 no filtro de 585 ± 40 nm (detector FL2), 24 h após incubação com os derivados xantônicos (20,0 μ M).	102
Figura 34. Histogramas representativos da análise, por citometria de fluxo, da autofluorescência de células Caco-2 no filtro de 530 ± 15 nm (detector FL1), 24 h após incubação com os derivados tioxantônicos (20 μ M).....	103
Figura 35. Avaliação da fluorescência das células Caco-2 expostas aos derivados tioxantônicos (20 μ M) durante 24 h, avaliada por espectrometria de fluorescência.	104
Figura 36. Histogramas representativos da análise, por citometria de fluxo, da autofluorescência de células Caco-2 no filtro de 585 ± 40 nm (detetor FL2), 24 h após incubação com os derivados tioxantônicos (20,0 μ M).....	105

Figura 37. Atividade da glicoproteína-P avaliada por espectroscopia de fluorescência em células Caco-2 expostas aos derivados xantônicos (20 µM) apenas durante os 90 minutos do período de incubação com o substrato fluorescente (RHO 123, 10 µM).	107
Figura 38. Atividade da glicoproteína-P avaliada por espectroscopia de fluorescência em células Caco-2 pré-expostas aos derivados xantônicos (20 µM) durante 24 h.	108
Figura 39. Níveis de expressão de P-gp em células Caco-2 expostas aos derivados xantônicos X4 e X7 (20 µM) durante 24 h.	109
Figura 40. Atividade da glicoproteína-P avaliada por espectroscopia de fluorescência em células Caco-2 expostas aos derivados tioxantônicos (20 µM) apenas durante os 90 minutos do período de incubação com o substrato fluorescente (RHO 123, 10 µM).	112
Figura 41. Atividade da glicoproteína-P avaliada por espectroscopia de fluorescência em células Caco-2 pré-expostas aos derivados tioxantônicos (20 µM) durante 24 h.	112
Figura 42. Níveis de expressão de P-gp em células Caco-2 expostas a Tx1 e Tx5 (20 µM) durante 24 h.	113
Figura 43. Citotoxicidade da Daunorrubicina (0 – 100 µM) avaliada, em células Caco-2, pelo ensaio da incorporação do NR, 24 h após exposição ao substrato da P-gp.	118
Figura 44. Citotoxicidade da Daunorrubicina (0 – 100 µM) avaliada, em células Caco-2, pelo ensaio da incorporação do NR, 24 h após exposição ao substrato da P-gp.	120
Figura 45. Citotoxicidade da Daunorrubicina (0 – 50 µM) avaliada, em células Caco-2, pelo ensaio da incorporação do NR, 24 h após exposição ao substrato da P-gp.	123
Figura 46. Citotoxicidade da quinidina (0 – 200 µM) avaliada, em células Caco-2, pelo ensaio da incorporação do NR, 24 h após exposição ao substrato da P-gp na presença ou ausência dos derivados X4 e X7 (20 µM) ou do inibidor específico da P-gp, ZOS (5 µM).	125

Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais famílias de transportadores ABC.	5
Tabela 2: Principais classes de substratos da P-gp e respectivos exemplos	18
Tabela 3: Inibidores da atividade da P-gp mais relevantes a nível clínico	26
Tabela 4: Compostos indutores da expressão da P-gp mais relevantes a nível clínico.	27
Tabela 5: Compostos ativadores da P-gp.....	28
Tabela 6. Valores IC ₅₀ (concentração que causa metade do efeito máximo), TOP (efeito máximo), BOTTOM (linha de base) e Hill Slope das curvas de concentração-resposta da Daunorrubicina (DAU), com (DAU + X4, X7 ou ZOS) ou sem (DAU) exposição posterior às xantonas X4 e X7 (20 µM) ou ZOS (5 µM).....	119
Tabela 7. Valores IC ₅₀ (concentração que causa metade do efeito máximo), TOP (efeito máximo), BOTTOM (linha de base) e Hill Slope das curvas de concentração-resposta da Daunorrubicina (DAU), com (DAU + Tx7 ou ZOS) ou sem (DAU) exposição posterior à Tx7 (20 µM) ou ZOS (5 µM).	121

Lista de abreviaturas

a.a – Aminoácidos

ABC – *ATP binding cassette*

AB – Peptídeo β amilóide

ADMET – Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e transporte

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

AUC – Área sob a curva (*Area under the curve*)

BCRP – Proteína de resistência ao cancro da mama

BCSFB – Barreira sangue-líquido cefalorraquidiano

BHE – Barreira Hematoencefálica

BSEP – Bomba de efluxo de sais biliares

CsA – Ciclosporina A

DAU – Daunorrubicina

DMEM – *Dulbecco's modified eagles medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DiBenzRif – 1,8-dibenzoil-rifampicina

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FBS – Soro de bovino fetal

Glu – Glucose

HBSS -/- – *Hanks' Balance Salt Solution without calcium and magnesium*

HBSS +/- – *Hanks' Balance Salt Solution with calcium and magnesium*

i.p. – Intraperitoneal

i.v. – Intravenoso

MAO – Monoamina oxidase

MDR – Fenómeno de resistência a multifármacos (*multidrug resistance*)

mRNA – RNA mensageiro

Lista de Abreviaturas

- MRP** – Proteína associada à resistência a multifármacos
- MTT** – Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
- NBDs** – Domínios de ligação a nucleótidos
- NEAA** – Aminoácidos não essenciais
- NR** – Vermelho Neutro (*Neutral red*)
- PBS** – Tampão Fosfato (*Phosphate buffer solution*)
- P-gp** – Glicoproteína P
- P_i** – Fosfato inorgânico
- PKC** – Proteína quinase C
- PQ** – Paraquato
- RHO 123** – Rodamina 123
- REZ** - Resazorina
- SLC** – Transportadores de soluto
- SNC** – Sistema Nervoso Central
- SRB** – Sulforodamina B
- TJ** – Junções apertadas (*Tight junctions*)
- TMDs** – Domínios transmembranares
- TMHs** – Alfa-hélices transmembranares
- Tx** - Tioxantona
- UV** – Ultravioleta
- Ver** – Verapamilo
- X** – Xantona
- ZOS** – Zosuquidar

I. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Transporte membranar e Transportadores Membranares

Os **transportadores membranares** são proteínas presentes nas membranas celulares de todos os tecidos. Estes transportadores, presentes maioritariamente nas membranas plasmáticas, podem promover o transporte (influxo e efluxo) de endobióticos e xenobióticos, tendo uma elevada influência na fármaco- toxicocinética e fármaco-toxicodinâmica dos compostos (DeGorter et al., 2012; Doring and Petzinger, 2014; Rives et al., 2017).

A capacidade de um composto para atravessar as membranas é dependente do peso molecular, tamanho, estrutura e hidrofobicidade, características que terão de ser coadunáveis com as características da barreira celular ou, alternativamente, promotoras de interação com determinadas proteínas transportadoras presentes na membrana celular (Doring and Petzinger, 2014). Assim, os mecanismos envolvidos no transporte poderão ser variados, podendo os mesmos ser passivos ou ativos, caso ocorram sem ou com consumo energético, respetivamente.

O transporte passivo compreende a **difusão simples**, onde compostos atravessam a membrana a favor do gradiente de concentração, podendo ocorrer por via transcelular ou paracelular, em que ocorre a passagem pela bicamada de fosfolípidos ou por poros na zona de junção entre as células, respetivamente. Já na **difusão facilitada**, outro mecanismo de transporte passivo, o transporte a favor do gradiente é facilitado por proteínas membranares/transportadores. A passagem através da membrana pode ainda ocorrer por **filtração**, mecanismo caracterizado pela passagem de xenobióticos dissolvidos através de fluxos aquosos, por poros existentes nas membranas ou poros existentes entre as membranas, em que o seu tamanho e dimensão vão influenciar o fenómeno. A filtração torna-se extremamente importante a nível glomerular e hepático, em que os poros são de grandes dimensões e permitem a passagem de compostos com peso molecular elevado (Doring and Petzinger, 2014).

Por outro lado, o **transporte ativo** divide-se em transporte ativo primário e secundário. O **transporte ativo primário** ocorre por hidrólise direta de adenosina trifosfato (ATP), enquanto que o **transporte ativo secundário** ocorre pela presença de

um outro substrato que, ao ser transportado, forma um gradiente que vai forçar o transporte do primeiro substrato. Existe ainda um terceiro mecanismo de transporte ativo, a **endocitose**, que ocorre por invaginação da membrana celular formando-se, assim, uma vesícula. Posteriormente, esta funde-se com os lisossomas para a digestão das moléculas transportadas. No caso de as moléculas transportadas se encontrarem no estado sólido o fenómeno denomina-se de **fagocitose**, enquanto que se estiverem no estado líquido denomina-se **pinocitose**. Este processo é bastante relevante a nível pulmonar, possibilitando a absorção de partículas insolúveis, nomeadamente de amianto, levando a um processo inflamatório e consequentes patologias pulmonares. É, também, bastante relevante a nível renal, ao promover a absorção de metais complexados com metalotioneínas, favorecendo a lise lisossomal, morte celular e consequente lesão renal (Doring and Petzinger, 2014).

Entre os transportadores membranares, destacam-se duas superfamílias: a dos **transportadores de soluto** (SLC, de *Solute carrier*) e a dos **transportadores ATP binding cassette** (ABC), que transportam os compostos por mecanismos passivos ou ativos secundários, no caso dos transportadores SLC, ou por mecanismos ativos primários, no caso dos transportadores ABC.

Os **transportadores SLC** têm um papel relevante no influxo de endobióticos e xenobióticos (Rives et al., 2017). As famílias pertencentes a esta superfamília estão subdivididas consoante o substrato que transportam. Por exemplo, a família SLCO transporta aniões orgânicos, a família SLC28 transporta nucleósidos, entre outras (Doring and Petzinger, 2014). Estes transportadores são particularmente importantes na captação de moléculas fisiologicamente essenciais, tais como açúcares, aminoácidos (a.a), iões inorgânicos, neurotransmissores, hormonas, vitaminas e fármacos (Rives et al., 2017).

A superfamília dos **transportadores ABC**, a que se dará maior relevância nesta dissertação de mestrado, engloba bombas de efluxo que, estando presentes em todas as células, estão mais expressas em tecidos barreira, nomeadamente intestino, barreira hematoencefálica (BHE), fígado, rins, assim como na barreira hemato-testicular e na placenta (Colabufo et al., 2009; Doring and Petzinger, 2014). Para além da membrana plasmática, fazem igualmente o efluxo dos seus substratos em

organelos celulares, como a mitocôndria, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e outras vesículas (Sharom, 2008). A superfamília de transportadores ABC é composta por 7 famílias, nomeadas de A a G, classificadas consoante as suas similaridades genéticas, homologia de sequências e sequência de domínios. Esta superfamília inclui, no Homem, 49 transportadores identificados que diferem na sua função. Os transportadores de maior importância, assim como os genes que os codificam e as respetivas funções, estão representados na Tabela 1 (Doring and Petzinger, 2014). Os transportadores pertencentes a esta superfamília mais relevantes na limitação da biodisponibilidade de endobióticos e xenobióticos são a glicoproteína-P (MDR1/ABCB1), a proteína de resistência ao cancro da mama (BCRP/ABCG2) e as proteínas associadas à resistência a multifármacos (MRP/ABCC) (Gameiro et al., 2017; Silva et al., 2015).

Tabela 1: Principais famílias de transportadores ABC. Adaptado de (Doring and Petzinger, 2014).

Transportadores ABC		
Gene	Nome comum	Função geral
ABCB1	Glicoproteína-P (MDR1/P-gp)	Efluxo de xenobióticos e endobióticos no intestino, cérebro, rins e fígado, entre outros órgãos
ABCB11	Bomba de efluxo de sais biliares (BSEP)	Transporte de sais biliares
ABCC1	Proteína associada à resistência a multifármacos 1 (MRP1)	Bomba de efluxo que promove a resistência a múltiplos fármacos em diversos tecidos (fígado, rins, intestino, placenta, barreira hematoencefálica, entre outros)
ABCC2	Proteína associada à resistência a multifármacos 2 (MRP2)	Efluxo de aniões orgânicos, conjugados com ácido glucurónico e glutatona e excreção biliar
ABCC3	Proteína associada à resistência a multifármacos 3 (MRP3)	Efluxo de aniões orgânicos, conjugados com ácido glucurónico e glutatona
ABCC4	Proteína associada à resistência a multifármacos 4 (MRP4)	Efluxo de aniões orgânicos e transporte de nucleósidos
ABCC5	Proteína associada à resistência a multifármacos 5 (MRP5)	Transporte de nucleósidos

Transportadores ABC		
Gene	Nome comum	Função geral
ABCC6	Proteína associada à resistência a multifármacos 6 (MRP6)	Transporte de conjugados com a glutatona
ABCC10	Proteína associada à resistência a multifármacos 7 (MRP7)	Efluxo de aniões orgânicos e alcaloides da vinca
ABCC11	Proteína associada à resistência a multifármacos 8 (MRP8)	Efluxo de aniões orgânicos e nucleótidos cíclicos
ABCC12	Proteína associada à resistência a multifármacos 9 (MRP9)	Não definidas
ABCG2	Proteína de resistência ao cancro da mama (BCRP)	Efluxo de aniões orgânicos, conjugados com sulfatos e excreção biliar

A farmacocinética e toxicocinética de xenobióticos e endobióticos são dependentes do fenómeno ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e transporte). O transporte e o processo metabólico de xenobióticos no organismo ocorrem em 4 fases (Szakacs et al., 2008). A fase 0 corresponde à entrada do xenobiótico, mediado por transportadores SLC, do sangue para uma célula metabolizadora ou para órgãos alvo, participando, assim, no processo de absorção. A fase 1 é onde ocorrem as reações de funcionalização (ex.: oxidações, reduções e hidrólises) dos compostos, de modo a minimizar as interações diretas com alvos intracelulares. A fase 2 é onde ocorre a conjugação com compostos endógenos (ex.: com glucuronídeos, sulfatos ou glutatona), de modo a promover o aumento do tamanho, polaridade e hidrofília dos compostos, para estes serem mais facilmente excretados. Por fim, a fase 3 corresponde à excreção da célula do metabolito conjugado, ou do composto inalterado, por um transportador ABC, limitando a absorção de compostos com elevada permeabilidade passiva. Contudo, a fase 3 também facilita a excreção de compostos com baixa permeabilidade passiva, como é o caso de conjugados da fase II ou compostos tóxicos (Doring and Petzinger, 2014; Gameiro et al., 2017; Szakacs et al., 2008).

Os transportadores ABC estão envolvidos na fase 3 do transporte de compostos, pelo que têm um papel essencial na farmacocinética dos mesmos,

promovendo a sua excreção para o sangue, urina, bÍlis e fezes (Doring and Petzinger, 2014). A dioxina é um dos fármacos excretados por mecanismos mediados por estes transportadores (Ghibellini et al., 2006; Hori et al., 1993). Compostos como captopril, ibuprofeno e iodipamina são excretados para a urina por mecanismos mediados pelos transportadores ABC (van Ginneken and Russel, 1989). Agentes antineoplásicos, como o caso da elsamitrucina, o irinotecano, o paclitaxel, a cisplantina e a vincristina são excretados para a bÍlis e fezes, assim como a aspirina, ibuprofeno, paracetamol, talinolol, sinvastina e ainda alguns antihistamÍnicos como a fexofenadina, entre muitos outros (Ghibellini et al., 2006).

Ao transportar endobiÓticos, a superfamÍlia ABC torna-se muito importante nas vias de sinalização celular, no efluxo de nutrientes, esteroides, sais biliares, vitaminas, polissacarÍdeos, fosfolÍpidos, íons, sais biliares, a.a, entre outros (Silva et al., 2015b). Ao promover o efluxo de substratos como fármacos, condicionam a sua farmacocinética e, conseqüentemente, a sua toxicidade e eficácia terapêutica, pois contribuem para a redução da sua biodisponibilidade/acumulação nos tecidos/órgãos alvo e, por último, no organismo.

Os transportadores ABC são bastante inespecÍficos nos substratos transportados, sendo que diferentes famÍlias possuem afinidade para diferentes substratos, havendo partilhas/sobreposições dos mesmos. Por exemplo, a calceína é simultaneamente substrato da P-gp e da MRP1, a rifampicina é substrato da P-gp e da BSEP, a vimblastina é substrato da MRP1, da BSEP e da P-gp. Por outro lado, substratos como a nifedipina são especÍficos da P-gp, a glutatona é especÍfica do MRP1 e a clofazimina é especÍfica da BSEP (Deeley and Cole, 2006; Kis et al., 2009; Sharom, 2008; Zhou et al., 2008).

Estruturalmente os transportadores ABC são tipicamente constituÍdos por um par de domÍnios de ligação a nucleótidos (NBDs), localizados no citoplasma e onde se liga o ATP (Figura 1). Estes domÍnios possuem duas sequências *motif* localizadas nos a.a 100-200, designadas *Walker A* e *Walker B*, as quais estão presentes em todos os transportadores pertencentes a esta superfamÍlia. O *Walker A motif* possui um resÍduo de lisina que está envolvido na ligação do β -fosfato do ATP, enquanto que o resÍduo de ácido aspártico do *Walker B motif* interage com o Mg^{2+} , um ío que parece ser

indispensável para que ocorra a hidrólise do ATP. As proteínas pertencentes à superfamília ABC possuem a particularidade de conterem entre o *Walker A* e *B*, uma terceira sequência de aminoácidos (ALSGGQ), designada por *motif C*. Embora ainda não se conheça exatamente a sua função, sabe-se que está envolvida no reconhecimento, ligação e hidrólise do ATP (Leslie et al., 2005; Sharom, 2008). A estrutura típica dos transportadores ABC é, também, constituída por dois conjuntos de domínios transmembranares (TMDs), normalmente contendo 6 alfa-hélices transmembranares (TMHs) cada, as quais formam os locais de ligação dos seus substratos (Figura 1) (Sharom, 2008). No entanto, alguns transportadores desta superfamília não apresentam a estrutura típica acima referida, como é o caso da BCRP que é constituída por um único NBD e um único TMD, e alguns MRPs, que apresentam um TMD extra com cinco TMHs (Gameiro et al., 2017).

O presente trabalho foca-se no transportador P-gp, pelo seu papel ativo no efluxo de compostos em tecidos sensíveis, pela sua elevada expressão em diversos tecidos e, igualmente, pela sua influência notória na farmacocinética e farmacodinâmica dos seus substratos.

1.2. Glicoproteína P (P-gp)

A P-gp foi a primeira bomba de efluxo a ser descrita e a melhor caracterizada, dado o seu importante papel no desenvolvimento do fenómeno de resistência a multifármacos (MDR, de *multidrug resistance*), sendo também reconhecida também como ABCB1/MDR1 (Zhou, 2008). Foi descoberta por Juliano and Ling (1976), em células de ovário de hámster chinês, e caracterizada como uma glicoproteína de superfície, cuja atividade depende de ATP. Nesse estudo, esta estrutura foi chamada de P-gp por alterar a permeabilidade dos fármacos. Percebeu-se, igualmente, que a P-gp controlava a permeabilidade dos seus substratos ao modular as propriedades hidrofóbicas de regiões membranares (Juliano and Ling, 1976).

A P-gp é codificada pelo gene *ABCB1*, que foi clonado pela primeira vez em 1985 por Riordan, num estudo realizado em linhas celulares mamárias com resistência a multifármacos (CH^RB30) (Riordan et al., 1985). Este gene localiza-se no cromossoma

7q21.12 a 25kb do gene *ABCB4* (Hodges et al., 2011). O gene *ABCB1* possui 29 exões numa região genómica que abrange 209.6kb, sendo que dois exões 5' não são transcritos. Possui um promotor no intrão e no exão 1, para promover a expressão, e um promotor distal oculto, que só está ativo em linhas celulares resistentes a fármacos específicos e em amostras de pacientes com cancro, sendo que a sua ativação promove o aumento da expressão da proteína (Wang et al., 2006). A região promotora do gene *ABCB1* contém uma baixa frequência de polimorfismos e é bastante estável comparativamente a outros genes presentes no genoma (Hodges et al., 2011).

1.2.1. Estrutura da P-gp

A P-gp tem um peso molecular de 170 KDa, sendo composta por 1280 a.a, organizados em 2 repetições em *tandem* de 610 a.a, juntas por uma região de aproximadamente 60 a.a. A P-gp é sintetizada no reticulo endoplasmático e apresenta a estrutura típica dos transportadores ABC, sendo constituída por 2 metades homólogas, cada uma delas constituída por um NBD, localizado no lado citoplasmático da membrana e onde se liga o ATP, e por um TMD composto por 6 α -hélices transmembranares, as quais formam os locais de ligação dos seus substratos (Figura 1). As duas metades homólogas desta proteína interagem, devido à flexibilidade do local de ligação que liga as duas metades, permitindo a comunicação entre os dois locais de ligação do ATP, sendo esta região fosforilada pela proteína quinase C (PKC). Devido à sua estrutura típica, a P-gp é considerada um transportador completo (*Full-transporter*) (Gameiro et al., 2017; Linnet and Ejsing, 2008; Silva et al., 2015b; Zhou, 2008).

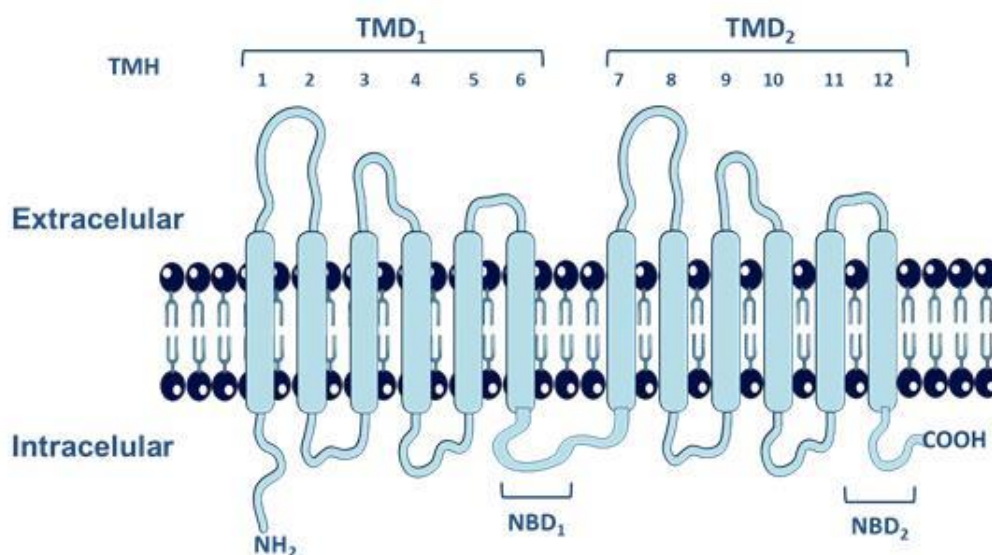


Figura 1. Estrutura topológica da P-gp. Adaptado de (Gameiro et al., 2017).

1.2.2. Localização e função fisiológica da P-gp

A P-gp localiza-se na membrana plasmática de células polarizadas de tecidos como o intestino, fígado, rins, barreira hematoencefálica (BHE), barreira do ouvido (onde é expressa nas células capilares endoteliais da cóclea e vestibula), entre outros (Figura 2). A sua localização sugere que tenha um carácter protetor de tecidos sensíveis contra xenobióticos, assim como um envolvimento no processo de excreção.

A P-gp tem um papel essencial a nível fisiológico, protegendo as células contra xenobióticos tóxicos e metabolitos endógenos presentes no sistema circulatório (Lopes et al., 2018; Silva et al., 2014b). A farmacocinética e, conseqüentemente, a eficácia de fármacos pode, igualmente, ser bastante afetada pela funcionalidade e níveis de expressão desta bomba de efluxo (Torres-Vergara and Penny, 2018).

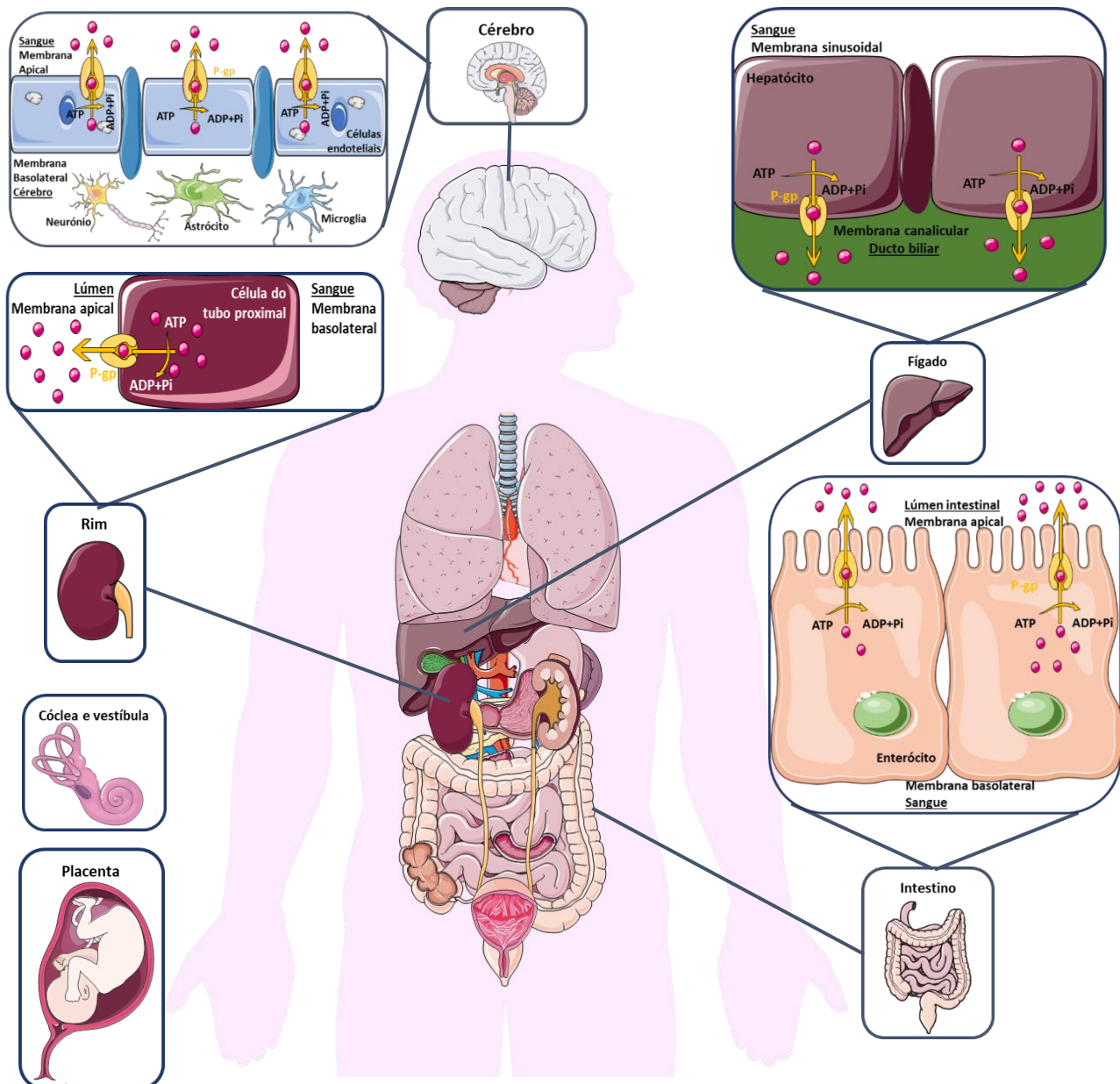


Figura 2. Localização da P-gp nos enterócitos, hepatócitos, células proximais renais e células endoteliais da barreira hematoencefálica. Imagem criada com base na informação disponível em Estudante et al. (2013), Bhaskar et al. (2010), Kock and Brouwer (2012) e Morrissey et al. (2013).

A importância desta bomba de efluxo na absorção e excreção de compostos torna-se evidente no **intestino**. Neste órgão, ocorre a absorção e excreção de endobióticos e xenobióticos ingeridos por via oral (Pang, 2003; Yoshida et al., 2013). No intestino delgado é onde ocorre maioritariamente a absorção dos compostos ingeridos, nomeadamente no duodeno e jejuno, em consequência da sua grande área

Introdução

de superfície que está associada à presença de vilosidades e microvilosidades (Oostendorp et al., 2009; Pang, 2003). A absorção ocorre, também, pela presença de enzimas de conjugação, de citocromo P450 3A4, e igualmente pela presença de bombas de efluxo e influxo, localizadas nas membranas apical e basolateral (Pang, 2003; Varma et al., 2010; Yoshida et al., 2013).

A P-gp é uma das bombas de efluxo altamente expressa na membrana apical dos enterócitos (Figura 2), fazendo o transporte dos seus substratos do interior do enterócito para o lúmen intestinal. A sua expressão difere ao longo do intestino, sendo superior no íleo e colon, comparativamente ao jejuno e duodeno, e, conseqüentemente, existem diferenças em termos de absorção (Doherty and Charman, 2002; Estudante et al., 2013).

A P-gp e o citocromo P450 3A4 (principal isoenzima envolvida na fase I do processo metabólico dos fármacos), possuem um espectro de substratos bastante amplo, tendo a capacidade de se ligarem a inúmeros compostos estruturalmente distintos e sem relação funcional, permitindo que estas duas proteínas estejam intimamente ligadas à toxicocinética de um grande espectro de compostos ingeridos por via oral (Yoshida et al., 2013). Na realidade, estas proteínas funcionam em conjunto como uma barreira bastante eficaz, onde a P-gp faz a excreção dos compostos e, apesar da reabsorção repetida destes, é assegurada a exposição dos mesmos às enzimas metabolizadoras, nomeadamente a CYP3A4, impedindo que compostos potencialmente tóxicos entrem na corrente sanguínea e encontrem o seu órgão alvo (Estudante et al., 2013). A P-gp consegue, de facto, limitar a absorção de vários compostos usados na terapêutica, como antibióticos, imunossuppressores, glicosídeos cardíacos, agentes anticancerígenos, entre outros (Estudante et al., 2013; Szakacs et al., 2008; Yoshida et al., 2013).

O papel desta bomba no processo de destoxificação é evidente no fígado e rins (Inui et al., 2000). O **fígado** é o órgão responsável pela síntese e excreção do ácido biliar, pelo metabolismo e transporte de colesterol, do mesmo modo que promove o metabolismo e efluxo de compostos endógenos e xenobióticos (Kock and Brouwer, 2012). Deste modo, torna-se um órgão essencial no processo de destoxificação (Kock and Brouwer, 2012; Zhou et al., 2008). Cerca de 80% da massa total do fígado é constituída por hepatócitos, e a localização de transportadores nas membranas

apical/canalicular e basolateral/sinusoidal dos mesmos, confere-lhes uma composição e função distinta. Estes possuem uma natureza polarizada, organização em lâmina e estão separados por *tight junctions* (TJ). Este tipo de separação entre hepatócitos permite um transporte vetorial de compostos endógenos e xenobióticos do sangue para a bÍlis (Jonker et al., 2009; Kipp and Arias, 2000; Kock and Brouwer, 2012; Mottino and Catania, 2008).

As membranas apical e basolateral possuem uma expressão de transportadores distinta (Figura 2). Assim, a membrana sinusoidal possui transportadores de influxo, o que permite a entrada de compostos do sangue para os hepatócitos, tornando os transportadores sinusoidais mediadores do primeiro passo da eliminação hepática (Hagenbuch, 2010; Mottino and Catania, 2008). Em contrapartida, a membrana canalicular é composta por transportadores de efluxo, como é o caso da P-gp, que contribui para a excreção para a bÍlis de glutathiona e conjugados, conjugados com glucuronídeos/sulfatados, sais biliares mono aniónicos e bicarbonato (DeGorter et al., 2012; Kock and Brouwer, 2012). No entanto, as duas membranas possuem diversos transportadores de efluxo. Na membrana canicular encontram-se transportadores como BSEP, P-gp, MRP2 e BSRP, e na membrana sinusoidal transportadores como MRP3,4 e 5, que mediam a excreção para a bÍlis ou para o sistema circulatório, respetivamente (Kock and Brouwer, 2012; Schinkel and Jonker, 2003; van Montfoort et al., 2003).

Os **rins** possuem como funções a manutenção da homeostasia eletrolítica, de fluídos e nutrientes, assim como a eliminação de compostos potencialmente tóxicos e resíduos metabólicos para a urina e, conseqüentemente, a sua excreção do organismo. Estes órgãos são constituídos por nefrónios, compostos por glomérulos e túbulos renais (Lee and Kim, 2004; Morrissey et al., 2013). Os túbulos renais auxiliam no processamento de compostos a nível renal, assim como na variabilidade na distribuição dos mesmos. A existência de transportadores membranares nestes tecidos permite que os mesmos possuam um papel essencial na função de reabsorção e secreção. Um dos transportadores presentes na membrana apical destes túbulos renais é a P-gp (Figura 2), que auxilia no efluxo de substratos para o filtrado glomerular (Anzai and Endou; Morrissey et al., 2013; Russel et al., 2002).

A relevância da P-gp na proteção de órgãos sensíveis é extremamente evidente no **sistema nervoso central (SNC)**. O SNC possui elevada sensibilidade a um grande espectro de substratos, desde produtos exógenos a endógenos, incluindo produtos produzidos no próprio órgão como resultado de processos metabólicos (EIAli and Hermann, 2011; Loscher and Potschka, 2005). O SNC possui uma exigência metabólica bastante elevada, necessitando de consumir 20% do oxigênio e aproximadamente 25% da glucose (Glu) disponível no organismo. Assim, o influxo de substratos como eletrólitos (Na^{2+} , K^+ , Ca^{2+}) e nutrientes (Glu, a.a e nucleótidos) é essencial para o correto funcionamento do mesmo (Hawkins and Davis, 2005). No entanto, o efluxo destes compostos é igualmente relevante pois, devido à sensibilidade do SNC uma potencial acumulação, podem ocorrer efeitos neurotóxicos (EIAli and Hermann, 2011; Hawkins and Davis, 2005).

A seleção dos compostos que tem acesso ao SNC é realizada pela BHE e pela barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (BCSFB) (Sun et al., 2003). A BHE é uma barreira física e metabólica que se encontra entre o encéfalo e o sistema circulatório, tendo como função a proteção e regulação do microambiente do cérebro, onde se encontram células neuronais e células da glia. Esta é complexa, tendo por base uma monocamada de células endoteliais a nível dos capilares do cérebro que apresentam TJ entre células adjacentes e escassez de fenestras e vesículas pinocitóticas, condicionando a entrada dos compostos no SNC (Girardin, 2006; Loscher and Potschka, 2005). A BCSFB está presente no plexo coroide, local onde é segregado o fluído cerebrospinal. Esta barreira é composta essencialmente por células epiteliais do plexo coroide e, assim como a BHE, limita a passagem de compostos pela presença de TJ entre as mesmas, separando assim o plasma do compartimento do fluído cerebrospinal (Girardin, 2006; Sun et al., 2003).

Estas barreiras, em conjunto, funcionam como um escudo protetor do SNC, que permitem a passagem de certos compostos do sangue para as células endoteliais do cérebro e células epiteliais do plexo coroide (Girardin, 2006). Apenas moléculas de pequenas dimensões (<500Da) ou muito lipofílicas de origem sanguínea, conseguem atravessar as barreiras sem a utilização de transportadores. No caso de moléculas de elevado peso molecular/dimensões, mas bastante importantes para o cérebro como é o caso da insulina e leptina, existem recetores membranares especializados que

promovem o processo de endocitose das mesmas. Para o transporte de outros compostos relevantes para o SNC, existem os transportadores de influxo e efluxo, que mantêm o gradiente de moléculas orgânicas, metabolitos e nutrientes (Figura 2) (ElAli and Hermann, 2011; Girardin, 2006; Sun et al., 2003).

A P-gp é um dos transportadores de efluxo expresso nestas membranas, estando presente na membrana apical/luminal da BHE (Figura 2) e na membrana apical da BCSFB, e fazendo o transporte dos seus substratos para o sangue (Bhaskar et al., 2010; Sun et al., 2003). A atividade deste transportador pode, no entanto, ser modulada por alterações fisio/patológicas. No estudo de Torres-Vergara and Penny (2018) verificou-se que a penetração de mediadores endógenos (ex.: interleucina-1 β) e xenobióticos, incluindo fármacos usados em tratamentos (ex.: glucocorticoides), pode ser alterada por processos inflamatórios que afetam a atividade e/ou expressão da P-gp (Torres-Vergara and Penny, 2018). Devido à presença da P-gp na BHE, esta torna-se essencial ao nível da farmacodinâmica e farmacocinética de compostos endógenos, estando, por isso, envolvida no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, sendo estes fenómenos explicados na secção 2.6.

1.2.3. Polimorfismos do gene *ABCB1*

1.2.3.1. Principais polimorfismos

Estão descritos 1279 polimorfismos de nucleótido único (SNPs, de *single-nucleotide polymorphism*) na região do gene *ABCB1*, onde 61 são codificantes. A variação de frequência de SNPs está relacionada com a etnia dos indivíduos. Por exemplo, para este gene, são observados 124 SNPs em Caucasianos, 134 em Africano-americanos, 153 em Chineses e 166 em Japoneses (Hodges et al., 2011). Os polimorfismos mais comuns da P-gp são: rs1128503 1236GT>C, rs2032582 2677T>G/A e rs1045642 3435T>C (Fujii et al., 2012).

O primeiro possui uma frequência alélica de 30 a 93%, variando consoante a etnia do indivíduo, sendo que o alelo C tem uma menor frequência em asiáticos,

enquanto que o alelo T possui menor frequência em africanos (Hodges et al., 2011). Demonstrou-se que este polimorfismo existente no exão 12 causa instabilidade proteica, estando associado a alterações na atividade da P-gp quando ligado aos polimorfismos 2677T e 3435T (Fromm et al., 2000; Kim et al., 2001).

O segundo polimorfismo situa-se no exão 21, trata-se de um polimorfismo trialélico assimétrico, extremamente estudado pelo facto de poder alterar um dos a.a da P-gp, levando a uma alteração de Ala 893 para Ser/Thr 893. A sua frequência alélica varia entre 2 e 65% na população mundial. A alteração no a.a para a serina 893 leva à alteração de um resíduo lipofílico para um hidrofílico, com consequentes alterações na atividade e expressão da P-gp (Fujii et al., 2012; Hodges et al., 2011; Leschziner et al., 2007). Estudos envolvendo este polimorfismo descreveram aumentos (Yamauchi et al., 2002), diminuição (Kim et al., 2001) e ausência de efeitos na atividade da P-gp (Annese et al., 2006).

O último SNP localiza-se no exão 26, possui uma frequência na população entre 34 e 90%. Este SNP não leva a alterações em nenhum a.a da P-gp. No entanto, foi estabelecida uma associação entre o polimorfismo 3435T e a alteração da função da P-gp. De facto, verificou-se que o genótipo 3435TT diminuía a expressão da P-gp no intestino e aumentava, assim, os níveis de dioxina a nível plasmático, quando comparado com o genótipo CC (Fujii et al., 2012; Hodges et al., 2011; Hoffmeyer et al., 2000). Demonstrou-se também que este polimorfismo cria instabilidade proteica, restringindo funcionalmente a P-gp (Cascorbi et al., 2001).

Estes três polimorfismos estão bastante próximos e demonstrou-se que a sua combinação está associada a um aumento do efluxo de substratos da P-gp, como é o caso da fexofenadina (Kim et al., 2001; Leschziner et al., 2007; Wong et al., 2005).

1.2.4. Substratos da P-gp

Esta bomba de efluxo tem um vasto leque de substratos muito distintos em termos de tamanho ($\approx 250\text{Da}$ até 1850Da), função e estrutura, diferindo de moléculas pequenas, como catiões orgânicos, hidratos de carbono, a.a e alguns antibióticos, para macromoléculas como polissacarídeos e proteínas. A lipofilia, anfipatia, afinidade para

se ligar ao hidrogénio, peso molecular e área de superfície são características que tornam os compostos bons substratos da P-gp, sendo que a proteína tem capacidade de transportar compostos hidrofóbicos não carregados positivamente ou neutros (Linnet and Ejsing, 2008; Silva et al., 2015b).

A ligação do ATP e a sua hidrólise nos dois NBDs citoplasmáticos, demonstrou ser essencial para o transporte de substratos mediado pela P-gp. No entanto, o mecanismo exato de como a hidrólise do ATP é coordenada entre os dois NBDs, e de como essa energia é usada para o transporte do substrato, ainda não está completamente esclarecido. Adicionalmente, a estequiometria da hidrólise do ATP para o transporte de um substrato é, ainda, uma questão controversa, não se sabendo se a P-gp hidrolisa uma ou duas moléculas de ATP por cada molécula de substrato que transporta. No entanto, um grande número de estudos sugere que, de modo ao substrato ser transportado pela P-gp, sejam necessárias duas moléculas de ATP.

O substrato liga-se ao local de grande afinidade no TMDs (do lado citoplasmático), o que promove o aumento da afinidade do NBD para o ATP. Assim que o ATP se liga, ocorre uma alteração conformacional no NBD, levando a uma dimerização (fecho do dímero). Consequentemente, ocorre uma alteração conformacional da proteína, ficando o substrato orientado para o lado extracelular, e ocorrendo uma diminuição da afinidade do substrato para o TMD. A alteração conformacional ocorre por degradação do dímero NBD fechado, após a hidrólise de ATP, e é anterior à libertação da adenosina difosfato (ADP) e do fosfato inorgânico (P_i). A libertação de ADP + P_i , promove uma reestabilização imediata da P-gp na sua conformação original (ou seja, redireciona o local de ligação do substrato para o lado citoplasmático da bicamada fosfolipídica) (Higgins and Linton, 2004; Linton, 2007; Linton and Higgins, 2007; Silva et al., 2015b).

Como mencionado anteriormente, a P-gp possui um vasto leque de substratos que inclui uma grande variedade de fármacos. As principais classes terapêuticas em que estes se inserem, assim como outros grupos de xenobióticos, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Principais classes de substratos da P-gp e respectivos exemplos (Sharom, 2008; Silva et al., 2015b; Szakacs et al., 2008).

Classe	Exemplos
Agentes antimicrobianos	Eritromicina, doxiciclina, itraconazol, cetoconazol, levofloxacina, rifampicina, esparfloxacina, tetraciclina, grepafloxacina, claritromicina, gramicidina A e valinomicina
Analgésicos opioides	Morfina; fentanil e pentazocina.
Antagonistas dos recetores H ₂	Cimetidina e ranitidina
Antineoplásicos	Alcalóides da vinca (vimblastina, vincristina, etoposido e topotecano), taxanos (ortataxel, paclitaxel e docetaxel), agentes alcalinizantes (cisplatina e clorambucil), antimetabolitos (metotrexato, citarabina), antraciclina (doxorubicina e daunorubicina), epipodofilotoxinas (etoposídeo e teniposídeo), camptotecinas (topotecano), antracenos (bisantreno e mitoxantrona), inibidores da tirosina quinase (imatinib e gefitinib), entre outros (tamoxifeno)
Antiarrítmicos	Quinidina, amiodarona, propafenona, verapamilo, lidocaína;
Antidepressivos	Amitriptilina, nortriptilina, desipramina, trazadona e doxepina.
Antiepiléticos e Anticonvulsivantes	Felbamato, topiramato, fenitoína, carbamazepina e fenobarbital
Antidiarreicos	Loperamida
Antieméticos	Domperidona e ondansetrona
Anti-helmínticos	Ivermectina
Anti-hipertensores	Reserpina, propranolol, celiprolol, talinolol, losartan, prazosina e debrisoquina
Anti-histamínicos	Terfenadina, fexofenadina;
Antipsicóticos	Clorpromazina, flupentixol, trifluoperazina
Bloqueadores de canais de cálcio	Verapamilo, nifedipina, nicardipina, azidopina, bepridil, felodipina, nisoldipina, nitrendipina, tiapamil e diltiazem
Compostos Fluorescentes	Calceína-AM, Hoechst 33342, rodamina 123, BCECF-AM, Fluro-2 e Fura-2
Esteroides	Corticosterona, dexametasona, metilprednisolona, aldosterona, cortisol

Classe	Exemplos
Glicosídeos Cardíacos	Digoxina e digitoxina
Inibidores da acetaldéido desidrogenase	Dissulfiram
Inibidores da HMG-CoA redutase	Lovastatina, Sinvastatina
Inibidores da Protease do HIV	Ritonavir, saquinavir, nelfinavir, indinavir e amprenavir
Imunossupressores	Ciclosporina A, ciclosporina H, tacrolimus, sirolimus e valsopodar
Pesticidas	Metilparatião, paraquato, endosulfan, cipermetrina, fenvalerato
Produtos naturais	Flavonóides, curcuminóides, extracto de <i>Rhei rhizoma</i> e colchicina
Substratos fisiológicos	Hormonas esteróides (aldosterona, cortisol, deoxicorticosterona, progesterona, testosterona e corticosterona), fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomiéline), glicosfingolípidos simples (glucosilceramida, galactosilceramida e lactosilceramida), fatores ativadores de plaquetas; β -Estradiol 17-(β -D-glucuronido); peptídeo β -amilóide; peptídeos e várias Interleucinas

1.2.5. Papel da P-gp no fenómeno de resisténcia a multifármacos (MDR)

A capacidade das células para se protegerem contra xenobióticos potencialmente tóxicos é algo essencial a nível biológico (Higgins, 2007). Assim, as células cancerígenas têm, como mecanismo de defesa, uma expressão de P-gp superior à das células de tecidos normais (Szakacs et al., 2006). Este aumento de expressão torna-se relevante quando leva ao aumento do efluxo de fármacos antineoplásicos, um dos principais mecanismos de resisténcia a fármacos e que contribui para a faléncia terapéutica destes substratos (Prachayasittikul and Prachayasittikul, 2016). A Figura 3 representa o fenómeno de MDR na barreira hematoencefálica (BHE).

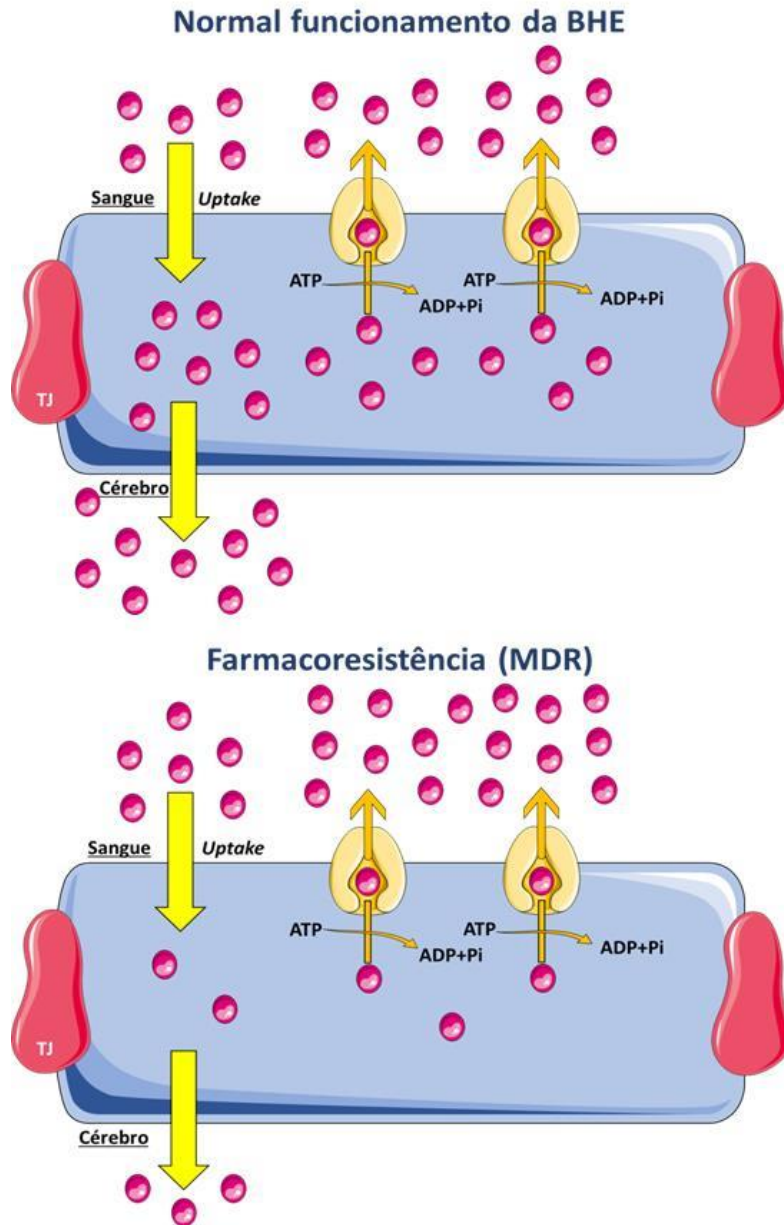


Figura 3. O fenômeno de resistência a multifármacos ao nível da barreira hematoencefálica (BHE) e a P-gp. Imagem criada com base na informação disponível em Prachayasittikul and Prachayasittikul (2016).

As células cancerígenas derivadas de tecidos que normalmente expressam P-gp (rins, intestino, fígado e pâncreas) têm elevado potencial para desenvolver intrinsecamente resistência a fármacos, mesmo antes das células serem expostas à quimioterapia. Por outro lado, em tecidos com baixos níveis de expressão da P-gp, as células cancerígenas vão apresentar os mesmos níveis de expressão até ao início da quimioterapia, momento a partir do qual ocorre o desenvolvimento de resistência aos fármacos administrados, devido ao aumento excessivo da expressão e/ou atividade da

P-gp (Sun et al., 2004). O aumento da expressão da P-gp é encontrado em muitos tipos de células cancerígenas e em muitas fases da doença (Prachayasittikul and Prachayasittikul, 2016). Alterações na atividade e expressão da P-gp, nomeadamente um aumento excessivo, leva ao desenvolvimento por parte de células cancerígenas de resistência a vários fármacos usados em quimioterapia (ex: doxorrubicina, paclitaxel, etoposido) (Higgins, 2007; Kobori et al., 2014).

Em 2014, verificou-se em células cancerígenas submetidas a quimioterapia que o aumento da transcrição do mRNA da P-gp (gene *ABCB1*) é influenciado por mecanismos epigenéticos, incluindo acetilação de histonas e metilação de DNA (Kobori et al., 2014). No entanto, os níveis de expressão e atividade da P-gp são também controlados por fatores pós-transducionais, afetando o tráfico da proteína para a membrana, assim como a sua localização e degradação, sem afetar os níveis de mRNA e síntese proteica (Kobori et al., 2014).

Muitos dos compostos utilizados na quimioterapia são substratos da P-gp. Assim, apesar dos tratamentos de quimioterapia, as células não vão responder positivamente, pois a P-gp vai impedir a acumulação intracelular dos compostos administrados, levando a que os tratamentos tenham uma eficácia abaixo da esperada (Prachayasittikul and Prachayasittikul, 2016).

Em estudos realizados por Assarat et al. verificou-se que há um aumento da expressão do gene *ABCB1* em células sujeitas a ciclos de quimioterapia (Assaraf et al., 1989a; b). Mais tarde, num estudo de Chan et al. (1997) realizado com 62 pacientes diagnosticados com osteossarcoma entre 1980 e 1989, que realizaram tratamento (quimioterapia) e dos quais estavam disponíveis amostras do tumor pré-tratamento, demonstrou-se uma sobre-expressão da P-gp em 27 pacientes. No entanto, tal não se verificou para 34 pacientes, e para um dos pacientes os resultados da expressão da proteína foram ambíguos. Estes 34 pacientes, num acompanhamento de, em média, 8,9 anos, obtiveram um aumento significativo de casos de sucesso de tratamento sem recaídas, assim como uma maior taxa de sobrevivência, comparativamente aos 27 pacientes que tinham uma sobre-expressão da P-gp no tumor. Assim, foi possível fazer uma correlação entre a expressão da P-gp em tumores e a ineficácia dos tratamentos em pacientes com osteossarcoma (Chan et al., 1997).

No estudo realizado por Tada et al. (2002) os níveis de mRNA de proteínas associadas ao fenómeno de MDR foram avaliados em 63 pacientes com cancro na bexiga, tendo-se verificado o aumento da expressão de 4 transportadores ABC (e.x. P-gp), após quimioterapia. Demonstrou-se, também aqui, que os níveis de mRNA da P-gp, MRP1 e MRP3 possuíam uma correlação negativa com a resposta ao tratamento com doxorrubicina, ou seja, apresentavam resistência a este composto anticancerígeno (Tada et al., 2002).

Diversos autores corroboraram esta informação ao terem encontrado uma associação entre os níveis de expressão do gene *ABCB1*, a resistência aos fármacos anticancerígenos e os prognósticos fracos em leucemia mielóide aguda, osteossarcoma, cancro da mama, de bexiga, dos ovários e do sistema nervoso central (Burger et al., 2003; Chan et al., 1997; Dorr et al., 2001; Perri et al., 2001; Tada et al., 2002; van der Zee et al., 1995).

Desta forma, percebe-se a relevância da regulação da **expressão e atividade** da P-gp, de forma a que haja uma **diminuição do efluxo** dos compostos utilizados na quimioterapia, de modo a haver um **aumento na sua eficácia terapêutica** nestes tipos de tratamentos (Burger et al., 2003; Chan et al., 1997; Dorr et al., 2001; Perri et al., 2001; Tada et al., 2002; van der Zee et al., 1995).

1.2.6. Papel da P-gp no desenvolvimento/progressão de doenças - Relevância no SNC

Está, igualmente, descrito o envolvimento da P-gp em doenças neurodegenerativas, tais como as doenças de Alzheimer, Parkinson, entre outras, devido ao envolvimento da mesma em processos fisiológicos e fisiopatológicos (Gameiro et al., 2017). A doença de Alzheimer é uma patologia que envolve um estado de demência geralmente relacionada com a idade, e que é caracterizada pelo excesso de polimerização e depósito de proteínas/peptídeos específicos disfuncionais, particularmente o peptídeo β amilóide (AB) (composto neurotóxico). O AB pode ser transportado bidireccionalmente pela BHE, sendo possível que a sua acumulação no cérebro ocorra pelo excesso de produção a nível cerebral, por uma diminuição/falta de

degradação do AB no cérebro, por uma diminuição da sua depuração (reduzido efluxo para fora do cérebro) ou por um aumento do influxo de AB através da BHE (Zlokovic, 2005). Está claro que a atividade insuficiente da P-gp leva ao progresso da doença Alzheimer, dado o seu envolvimento no efluxo do peptídeo para fora do cérebro (Gameiro et al., 2017). Está igualmente descrito que a acumulação de AB no cérebro está relacionada com uma diminuição da expressão da P-gp em indivíduos não doentes e idosos (Vogelgesang et al., 2002).

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa crónica, mais comum em indivíduos com mais de 50 anos de idade (Opara et al., 2017). Esta doença é caracterizada pela morte/degradação de neurónios dopaminérgicos na substância *nigra*, localizada no mesencéfalo, sendo as causas deste fenómeno desconhecidas (Ahmed et al., 2016; Opara et al., 2017). Polimorfismos da P-gp têm sido associados ao desenvolvimento desta doença, pois estes podem ter a capacidade de alterar a expressão e a atividade da P-gp (Ahmed et al., 2016). Num estudo realizado por Westerlund et al. (2008) verificou-se que há uma diminuição da atividade e/ou expressão da P-gp em indivíduos mais velhos, sendo que essa diminuição é mais acentuada em indivíduos com a doença. No mesmo estudo de Westerlund et al. (2008) verificou-se que indivíduos com a doença Parkinson possuíam níveis inferiores de mRNA do gene *ABCB1* (Westerlund et al., 2008). Num estudo realizado por Kortekaas et al. (2005) demonstrou-se que indivíduos doentes possuíam valores reduzidos de P-gp funcional, o que proporcionou a associação da P-gp disfuncional com o desenvolvimento da doença (Kortekaas et al., 2005). Pelo descrito anteriormente, pode concluir-se que a diminuição da atividade e expressão da P-gp parece estar associada à evolução da doença Parkinson.

1.2.7. Modulação da P-gp

A modulação ocorre quando determinados compostos possuem a capacidade de interferir com a expressão e/ou atividade de uma proteína, seja ao induzir ou reduzir a sua expressão, ou a ativar ou inibir a sua atividade. Assim, os compostos são classificados consoante a sua capacidade e forma de interferir com a P-gp. Se diminuïrem a expressão e/ou a atividade são classificados de **inibidores** da P-gp, se aumentarem a expressão da proteína são classificados de **indutores**, e por último se aumentarem a atividade, sem interferirem com a expressão, são classificados de **ativadores**, (Figura 4). No entanto, um composto pode apresentar uma sobreposição das ações acima mencionadas, assim como serem moduladores (indutores, ativadores ou inibidores) e simultaneamente substratos da proteína (Silva et al., 2015b).

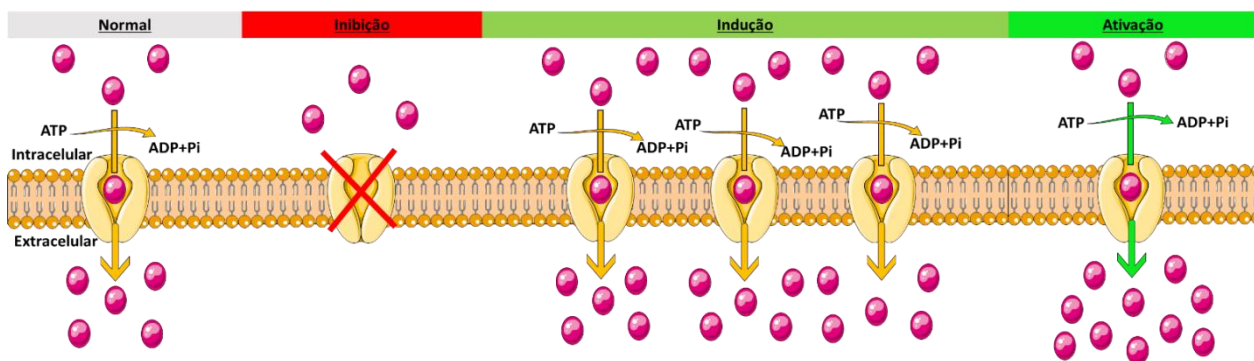


Figura 4. Representação gráfica da inibição, indução e ativação da P-gp, onde ocorre a redução da atividade, aumento da expressão e aumento da atividade da P-gp, respetivamente (Silva et al., 2015b).

Como foi referido anteriormente, a P-gp está altamente ligada à farmacocinética, farmacodinâmica e biodisponibilidade dos compostos. Como tal, compostos que tenham capacidade moduladora da mesma podem levar a efeitos indesejados na terapêutica, seja a interações medicamentosas, toxicidade ou falência terapêutica (Silva et al., 2015b).

1.2.7.1. Inibição

1.2.7.1.1. Principais inibidores

A P-gp possui um elevado número de compostos capazes de inibir a sua atividade. Os inibidores da P-gp estão classificados em 4 gerações, de acordo com a potência dos mesmos, a sua seletividade e o potencial de interação com outros compostos (Palmeira et al., 2012a). A **primeira geração** engloba compostos farmacologicamente ativos que já eram utilizados a nível clínico ou em estudos clínicos, e que posteriormente se descobriu a sua capacidade para inibir a P-gp. A **segunda geração** é composta por análogos dos compostos da primeira geração que sofreram alterações estruturais de forma a reduzir os seus efeitos terapêuticos iniciais e aumentar a sua eficácia enquanto inibidores da P-gp. Assim, estes compostos possuem uma afinidade superior para a P-gp comparativamente aos da primeira geração. Para ultrapassar as limitações destas duas gerações, nomeadamente a sua interação com outros transportadores e enzimas metabolizadoras, foi criada a **terceira geração** de inibidores, com recurso a relações quantitativas de estrutura e atividade e a química combinatória. Estes compostos foram desenvolvidos com o propósito de inibir a P-gp com elevada especificidade e potência, melhorando a eficácia dos tratamentos nos casos de fenómenos de MDR. Apesar da vontade de que esta geração de inibidores fosse eficaz na reversão do fenómeno de MDR, foram verificados efeitos adversos graves e as interações farmacocinéticas levaram à limitação destes compostos em ensaios clínicos. Assim, novas estratégias foram criadas para encontrar novos compostos inibidores da P-gp, tais como compostos extraídos de origem natural e seus derivados, surfactantes e lípidos, peptidomiméticos e agentes que combinam a inibição do transporte da P-gp com outra atividade biológica benéfica (duplos ligandos), surgindo a **quarta geração** de inibidores da P-gp (Silva et al., 2015b). Foi feita uma seleção dos compostos inibidores da P-gp mais relevantes a nível clínico e forense, os quais estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Inibidores da atividade da P-gp mais relevantes a nível clínico (Annese et al., 2006; Silva et al., 2015b).

Classe Farmacológica	Exemplos:
Agentes antimicrobianos	Cefoperazona, ceftriaxona, salinomicina, nigericina, eritromicina, azitromicina, brefeldin A, bafilomicina, claritromicina, valinomicina, metronidazol, monensina, salinomicina;
Antineoplásicos	Anti-androgénios: bicalutamida; Inibidores da tirosina kinases: gefitinib, lapatinib, erlotinib; Outros: Tamoxifeno, mitotano, lonafarnib, tesmilifeno, tifarnib; vimblastina;
Opioides	Metadona
Anti-histamínicos	Azelastina, astemizol, terfenadina;
Antidepressivos	Amoxapina, sertralina, paroxetina, fluoxetina;
Antipsicóticos	Clorpromazina, haloperidol, loxapina, perospirona, perfenazina, proclorperazina, trans-flupentixol, trifluoperazina;
Produtos Naturais	Canabinóides: Canabinol, curcumina

1.2.7.1.2. Mecanismos de inibição

A inibição desta bomba de efluxo pode ocorrer de forma indireta, através da inibição da sua atividade ATPásica (inibição da hidrólise do ATP) (Shapiro and Ling, 1997). Pode ocorrer pelo impedimento, por parte de um substrato, da ligação de outro substrato ao(s) local(ais) de ligação de forma competitiva, não competitiva ou alostérica (Varma et al., 2003). Por fim, pode ainda ocorrer pela alteração da integridade da membrana lipídica da célula, que assim inibe a atividade da P-gp (Drori et al., 1995).

1.2.7.2. Indução

1.2.7.2.1. Principais indutores

Existem diversos compostos capazes de induzir a expressão da P-gp. Como tal, foi feita uma seleção consoante a relevância clínica e estudos encontrados *in vitro* e *in vivo* (Silva et al., 2015b), estando a mesma representada na Tabela 4.

Tabela 4: Compostos indutores da expressão da P-gp mais relevantes a nível clínico. Adaptado de Silva et al. (2015b).

Classes:	Exemplos:
Antibióticos	Actinomicina D, rifampicina, doxiciclina, eritromicina;
Antineoplásicos	Clorambucil, colchicina, citarabina, doxorubicina, epirubicina, etoposido, Hidroxiureia, idarrubicina, Ifosfamida;
Anti-histamínicos	R-cetirizina;
Antidepressivos	Desvenlafaxina, nefazodona, trazodona; venlafaxina;
Antiepiléticos e anticonvulsivantes	Carbamazepina, pentilenotetrazol, fenobarbital, fenitona;
Antipsicóticos	Fenotriazina;
Analgésicos opioides	Morfina, oxicodona;
Cardiotónicos	Dioxina;
Derivados Sintéticos	Tioxantonas aminadas quirais:
Xantónicos e	(R)-1-((1-Hidroxiopropano-2-il)amino)-4-propoxi-9H-tioxanten-9-ona [ATx 2
Tioxantónicos	(-)];
	Xantonas dihidroxiladas:
	3,4-Dihidroxi-9H-xanten-9-ona (X1);
	1,2-Dihidroxi-9H-xanten-9-ona (X2);
	1,3-Dihidroxi-9H-xanten-9-ona (X3);
	2,3-dihidroxi-9H-xanten-9-ona (X4);
	3,6-dihidroxi-9H-xanten-9-ona (X5);
	Derivados Tioxantónicos:
	1-[(3-hidroxiopropil)amino]-4-propoxi-9H-tioxanten-9-ona (TX 1);
	1-cloro-4-hidroxi-9H-tioxanten-9-ona (TX 2);
	1-[2-(1,3-benzodioxol-5il)etil]amino-4-propoxi-9H-tioxanten-9-ona (TX3);
	1-[(2-metilpropil)amino]-4-propoxi-9H-tioxanten-9-ona (TX 4);
	1-(propano-2-ilamino)-4-propoxi-9H-tioxanten-9-ona (TX 5);

1.2.7.2.2. Mecanismos de indução

Os compostos potencialmente indutores podem promover a indução da expressão desta proteína de dois modos distintos, dependendo da sua capacidade para atravessar a membrana celular. Estes podem atravessar a membrana e ligarem-se a um recetor nuclear, que vai ativar a transcrição do gene *ABCB1* no núcleo, e promover assim a formação de mRNA e, conseqüentemente, a sua tradução em proteína (Callaghan et al., 2008). Por outro lado, podem ligar-se a um recetor membranar, que ativa a transdução de sinal e promove a formação de fatores transcripcionais, os quais vão ativar a transcrição do gene (Silva et al., 2015b).

1.2.7.3. Ativação

1.2.7.3.1. Principais ativadores

Existem diversos compostos capazes de aumentar de forma imediata a atividade da P-gp, estando descritos na Tabela 5 os principais compostos conhecidos como ativadores da P-gp.

Tabela 5: Compostos ativadores da P-gp.

Classes de compostos:	Exemplos:
Rifampicina reduzida (Vilas-Boas et al., 2013b)	Rifampicina reduzida (RedRif);
Xantonas dihidroxiladas (Silva et al., 2014b)	3,4-Dihidroxi-9H-xanten-9-ona (X1); 1,2-Dihidroxi-9H-xanten-9-ona (X2); 1,3-Dihidroxi-9H-xanten-9-ona (X3); 2,3-Dihidroxi-9H-xanten-9-ona (X4); 3,6-Dihidroxi-9H-xanten-9-ona (X5);
Xantonas Oxigenadas (Martins et al., 2019)	3,4-dimetoxi-1-metil-9H-xant-9-ona (OX1); 1-(dibromometil)-3,4 dimetoxi-1-metil-9H-xanten-9-ona (OX2); 3,4-dimetoxi-9-oxo-9H-xantona-1-carbaldeído (OX5); 1-(hidroximetil)-3,4-dimetoxi-9H-xanten-9-ona (OX6);

Classes de compostos:	Exemplos:
Derivados Tioxantónicos (Silva et al., 2015a)	1-[(3-hidroxipropil)amino]-4-propoxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona (TX 1); 1-cloro-4-hidroxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona (TX 2); 1-[2-(1,3-benzodioxol-5il)etil]amino-4-propoxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona (TX 3); 1-[(2-metilpropil)amino]-4-propoxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona (TX 4); 1-(propano-2-ilamino)-4-propoxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona (TX 5);
Tioxantonas aminadas quirais (Lopes et al., 2018)	(S)-1-((1-Hidroxiopropano-2-il)amino)-4-propoxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona [ATx 1 (+)]; (R)-1-((1-Hidroxiopropano-2-il)amino)-4-propoxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona [ATx 2 (-)]; (S)-1-((2-Hidroxipropil)amino)-4-propoxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona [ATx 3 (+)]; (R)-1-((2-Hidroxipropil)amino)-4-propoxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona [ATx 4 (-)]; (S)-1-((1-Hidroxi-4-metilpentano-2-il)amino)-4-propoxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona [ATx 5 (+)]; (R)-1-((1-Hidroxi-4-metilpentano-2-il)amino)-4-propoxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona [ATx 6 (-)]; (S)-1-((1-Hidroxi-3-metilpentano-2-il)amino)-4-propoxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona [ATx 7 (+)]; (R)-1-((1-Hidroxi-3-metilpentano-2-il)amino)-4-propoxi-9 <i>H</i> -tioxanten-9-ona [ATx 8 (-)];
Outros (Gameiro et al., 2017)	Bergamottin, epicatecina, imidazobenzotiazol, kaempferol, QB102, QB11, quercetina;

1.2.7.3.2. Mecanismos de ativação

O conceito de ativação é relativamente recente e, como tal, os mecanismos que promovem este fenómeno ainda não estão esclarecidos na sua totalidade. No entanto, foi proposto que a ativação possa ocorrer pela ligação de um substrato a um local de ligação que leva a uma alteração conformacional da P-gp e, conseqüentemente, promove o transporte de outro substrato que esteja ligado à proteína noutra local de ligação. Outra proposta para ocorrer a ativação da proteína é através do aumento da sua atividade ATPásica, pois a P-gp é dependente de ATP para ser funcional. Desta forma, o aumento da atividade ATPásica vai-se traduzir num aumento da atividade transportadora da P-gp (Silva et al., 2014b).

1.2.7.4. Estudos *in vitro* e *in vivo*

1.2.7.4.1. Inibição

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de compreender melhor o fenómeno de inibição desta proteína tão relevante.

No estudo de Loo and Clarke (2014) analisou-se o mecanismo de inibição da P-gp mediado pelo taraquidar, um potente inibidor da P-gp, em células HEK 293. De modo a atingir o objetivo referido, promoveu-se o desenvolvimento de células que expressassem P-gps mutantes. Após a expressão das mesmas, foi avaliada a sua atividade perante substratos e inibidores da P-gp (taraquidar a 500 nM durante 5 min) e a sua atividade ATPásica. Os resultados sugeriram que o taraquidar inibe o efluxo mediado pela P-gp ao impedir a transição da conformação fechada para a conformação aberta durante o ciclo catalítico. Verificou-se, também, que a interação do taraquidar com a P-gp não é dependente do NBD, visto que o inibidor conseguiu bloquear as P-gps mutantes que não continham NBDs (Loo and Clarke, 2014).

Num estudo de Vilas-Boas et al. (2013a) analisou-se como ocorre a inibição da P-gp por novos derivados da rifampicina, em células RBE4, modelo *in vitro* da BHE. Foi avaliada a expressão e atividade de transporte da P-gp, a sua atividade ATPásica, assim como a fluidez da membrana. Verificou-se que a 1,8-dibenzoil-rifampicina (DiBenzRif, 5 µM) não alterou significativamente a expressão da P-gp, após 24, 48 e 72 h de exposição. No entanto, promoveu um aumento significativo dos níveis intracelulares de RHO 123, substrato fluorescente da P-gp, em todos os tempos de incubação testados (30 min, 24 h e 48 h), demonstrando capacidade para inibição da P-gp. Este efeito foi associado à redução significativa dos níveis intracelulares de ATP, à inibição significativa da sua atividade ATPásica e a um aumento significativo da fluidez da membrana (Vilas-Boas et al., 2013a).

1.2.7.4.2. Indução e Ativação

Assim, como anteriormente referido, existiu igualmente um grande interesse por parte da comunidade científica em relação aos fenómenos envolvidos na indução e

ativação da P-gp, assim como na associação destes. Deste modo, inúmeros estudos têm vindo a ser realizados *in vitro*, *in silico* e *in vivo*. Num estudo realizado *in vivo* foi analisado o fígado, os rins, pulmões e baço de ratos após administração de dexametasona com o objetivo de verificar o seu potencial como antídoto em intoxicações com paraquato (PQ), um substrato tóxico da P-gp. Os animais foram divididos em 4 grupos de 8 animais, um grupo controlo, um grupo em que foi administrada dexametasona 100 mg/kg, um grupo em que foi administrado 25 mg/kg de PQ e por último, o grupo em que primeiramente foi administrado 25 mg/kg de PQ e 2 h depois 100 mg/kg de dexametasona [todas as administrações foram intraperitoneais (i.p.)]. Os animais foram eutanasiados 26 h após a administração do PQ, tendo-se verificado que a administração de dexametasona aumentou significativamente a expressão da P-gp a nível pulmonar, reduzindo significativamente a acumulação de PQ no pulmão e aumentando a sua excreção fecal (Dinis-Oliveira et al., 2006). Estava descrito em bibliografia prévia que o efeito que este composto tinha na expressão P-gp dependia do órgão, ou seja, a dexametasona aumentou significativamente a expressão da P-gp nos pulmões e no fígado; no entanto inibiu a sua expressão nos rins, podendo assim funcionar como indutor em determinados tecidos (Demeule et al., 1999).

Num estudo de Silva et al. (2014a) analisaram-se os efeitos que a colchicina tem na atividade e expressão da P-gp. Para tal efeito, usaram-se células Caco-2, de forma a avaliar o seu efeito na expressão e atividade da P-gp e a sua atividade ATPásica após exposição à colchicina (0–100 μ M) durante 24 h. Foi possível verificar que este composto se comporta como um indutor da P-gp (a expressão da P-gp aumentou significativamente entre 129% e 183%, 24 h após exposição a concentrações de colchicina entre 0,5 e 100 μ M, respectivamente, e quando comparado com as células controlo). Verificou-se, igualmente, que a colchicina aumentou significativamente a atividade ATPásica da P-gp, demonstrando ser ativamente transportada pela bomba. No entanto, apesar dos efeitos observados na expressão da proteína, não se observaram aumentos significativos na atividade da proteína para nenhuma das concentrações de colchicina testadas, após 24 h de exposição. A falta de efeito da colchicina ao nível da atividade de efluxo da P-gp foi explicada pela sua ação como inibidor competitivo, tal como demonstrado com os

resultados obtidos *in silico*. Este estudo demonstra a importância da avaliação simultânea da expressão e atividade da P-gp na pesquisa de novos indutores desta proteína, uma vez que um aumento da sua expressão nem sempre se traduz num aumento simultâneo da sua atividade, como se verificou neste estudo (Silva et al., 2014a).

Num estudo de Lopes et al. (2018) foi analisado o potencial modulador da P-gp de novas tioxantonas quirais ao nível da sua expressão e atividade. Foram utilizadas células Caco-2 para ver a influência destes compostos na expressão e na atividade de transporte da P-gp, assim como na atividade ATPásica da proteína. Foi possível verificar que estes compostos (20 μ M) tinham a capacidade de aumentar significativamente a atividade da P-gp sem interferir nos seus níveis de expressão, tendo sido, por esse facto, classificados como ativadores da P-gp. Verificou-se, também, a inexistência de enantiosseletividade nestes compostos. Este estudo torna-se bastante relevante por demonstrar que é possível ativar a proteína aumentando o efluxo de compostos sem interferir com a sua expressão (Lopes et al., 2018).

Num estudo de Silva et al. (2015a) foi avaliado o potencial de novas tioxantonas sintéticas para reduzir a citotoxicidade do PQ, um herbicida extremamente tóxico e conhecido substrato da P-gp (Silva et al., 2015b). Utilizaram-se, igualmente, as células Caco-2 para verificar se ocorriam alterações na atividade e/ou na expressão da P-gp na presença destes compostos (à concentração de 20 μ M), assim como na atividade ATPásica da proteína. Verificou-se que as novas tioxantonas estudadas tinham um grande potencial ativador e indutor da P-gp (24 h após exposição), assim como causaram um aumento significativo da atividade ATPásica da P-gp, expeto para um dos compostos testados. Para além disso, este estudo demonstrou que quatro das cinco tioxantonas testadas possuíam a capacidade de proteger as células contra a citotoxicidade do PQ, sendo essa proteção mediada pela P-gp (Silva et al., 2015a).

O estudo de Silva et al. (2014b), foi bastante inovador por realizar um estudo QSAR (*Quantitative structure-activity relationship*), sendo igualmente avaliado se a ativação e indução da P-gp mediadas por novas xantonas dihidroxiladas tinham potencial protetor contra a citotoxicidade do PQ. Assim, tal como no estudo anterior apresentado, foi analisada a atividade e expressão da P-gp, assim como a atividade

ATPásica da proteína, em células Caco-2. Percebeu-se que os compostos estudados (20 μ M) induziam e ativavam eficazmente a P-gp, assim como aumentavam a sua atividade ATPásica, tendo-se observado que forneciam igualmente proteção contra citotoxicidade do PQ, proteção essa igualmente mediada pela P-gp (Silva et al., 2014b).

Com o propósito de estudar a potencial capacidade moduladora da P-gp de novas xantonas oxigenadas, realizou-se um estudo semelhante onde se fizeram ensaios *in vitro* e *ex vivo*. Os ensaios *in vitro* foram realizados em células Caco-2, e compreenderam vários ensaios: ensaio de avaliação da expressão e atividade 24 h após exposição, onde as células foram expostas aos compostos em questão, durante 24 h, a 20 μ M; o ensaio de ativação, em que a exposição aos compostos (20 μ M) foi realizada aquando da adição de RHO 123 (2 μ M); e o ensaio da citotoxicidade do PQ, em que se realizou a exposição simultânea ao PQ (0-5000 μ M) e às xantonas oxigenadas (20 μ M) num período de 24 h. Verificou-se que grande parte dos compostos em estudo apresentava a capacidade moduladora da P-gp e que possuíam, também, um capacidade protetora contra a citotoxicidade do PQ. Os ensaios *ex vivo* foram realizados para o composto mais promissor (OX6) identificado nos ensaios *in vitro* descritos anteriormente, com o propósito de confirmar a sua capacidade ativadora da P-gp, usando sacos intestinais invertidos de ratos Wistar-Han. Demonstrou-se a capacidade do OX6 para aumentar significativamente a atividade da P-gp, por se verificar um aumento significativo do efluxo da RHO 123 nos sacos intestinais invertidos (Martins et al., 2019).

Foi, igualmente, realizado um estudo *ex vivo* com amostras de sangue de 65 indivíduos agrupados em idades (grupo 1: menores de 30 anos; grupo 2: maiores de 60 anos). Neste estudo, foi avaliada a atividade da P-gp em linfócitos de indivíduos do sexo masculino e caucasianos. Verificou-se, de acordo com os resultados obtidos, um aumento significativo da expressão da P-gp em indivíduos da faixa etária mais elevada (> 60 anos) quando comparado com indivíduos menores de 30 anos, aumento esse que não foi acompanhado por um aumento da atividade do transportador. Este facto pode estar relacionado com o facto de, com o aumento da idade, haver um aumento da acumulação de P-gp disfuncional, sendo que o organismo aumenta a sua expressão como mecanismo de defesa, numa tentativa de evitar uma perda de função da P-gp (Vilas-Boas et al., 2011).

Realizou-se um estudo em células RBE4, modelo *in vitro* da BHE, o qual foi acompanhado de estudos *in silico*. Neste estudo foi avaliada a citotoxicidade de novos derivados de rifampicina, incluindo rifampicina reduzida, peracetilada e mono-metoxilada, assim como o efeito destes compostos na expressão e atividade da P-gp. As células foram expostas aos compostos sintetizados durante 24, 48 e 72 h, a uma concentração de 5 μ M de rifampicina mono-metoxilada ou 10 μ M dos restantes. Ao analisar os resultados dos estudos *in silico* e *in vitro*, verificou-se que a rifampicina reduzida tem a capacidade de aumentar a expressão e atividade da P-gp. Por outro lado, verificou-se a sua capacidade de aumentar significativamente a atividade da proteína sem interferir com a sua expressão, sendo essa sua capacidade de ativação mais eficiente que a sua capacidade indutora. Deste modo, a vantagem de utilizar compostos ativadores advém do facto de este ser um processo mais rápido para influenciar a atividade da proteína quando comparado com a utilização de indutores (Vilas-Boas et al., 2013b).

1.2.7.4.2.1. Indutores e Ativadores como potenciais vias antidotais

Tal como referido anteriormente, foi realizado um estudo *in vivo* (Dinis-Oliveira et al., 2006) com ratos *Wistar* machos adultos divididos em 4 grupos de 8 animais, um grupo controlo, um grupo em que foi administrado dexametasona 100 mg/kg (i.p.), um grupo em que foi administrado 25 mg/kg de PQ (i.p.) e por último, o grupo em que primeiramente foi administrado 25 mg/kg de PQ (i.p.) e 2h depois 100 mg/kg de dexametasona (i.p.). Foi avaliada a taxa de sobrevivência dos animais ao longo do tempo e realizada a quantificação de PQ nos rins, baço, fígado e pulmões dias após a administração. Estava descrito em bibliografia prévia que a **dexametasona aumentava a expressão** da P-gp nos pulmões e fígado, tendo o efeito oposto nos rins (Demeule et al., 1999). Observou-se um **aumento da taxa de sobrevivência** dos animais do grupo ao qual se administrou dexametasona, sendo este fármaco considerado um indutor da proteína. De facto, a administração de dexametasona aumentou significativamente a expressão da P-gp a nível pulmonar, reduzindo significativamente a acumulação de PQ

no pulmão e aumentando a sua excreção fecal. Este aumento da taxa de sobrevivência resultou essencialmente da elevada atenuação do edema pulmonar provocado pelo PQ. Concluiu-se que o uso de dexametasona em casos de intoxicação com PQ aumenta a taxa de sobrevivência dos ratos nas referidas condições experimentais.

Num outro estudo já referido, *in vitro*, em células Caco2, estudou-se os efeitos que determinadas **tioxantonas** tinham na atividade e expressão da P-gp com consequentes implicações na citotoxicidade do PQ. Verificou-se que estes compostos estavam associados ao aumento significativo da atividade e expressão da P-gp e que, em células expostas ao PQ, diminuía significativamente o efeito citotóxico do mesmo. Assim, propôs-se que estas novas tioxantonas sintetizadas possuíam um **potencial antidotal** contra a citotoxicidade induzida pelo PQ (Silva et al., 2015a). Os resultados descritos no estudo descrito acima são concordantes com outros estudos publicados, como Martins et al. (2019), Silva et al. (2014b) e (Vilas-Boas et al., 2013b), descritos anteriormente.

1.2.7.5. Importância da modulação da P-gp na BHE

Realizou-se um estudo *in vivo* para ver os efeitos da inibição da P-gp na distribuição de um antidepressivo (escitalopram) em roedores. Para os estudos de farmacocinética utilizaram-se 10 ratos Sprague-Dawley machos com um peso entre 250-320 g. Estes foram divididos em grupos de 4-6 animais, mantidos em ciclos de 12 h de luz/escuro, a uma temperatura de 22 ± 1 °C. Os ratos foram divididos em dois grupos distintos com 5 animais cada, um grupo em que lhes foi administrado escitalopram e *veículo* e o outro grupo em que lhes foi administrado escitalopram e ciclosporina A (CsA). Em ambos os grupos foi realizada uma primeira administração intravenosa (i.v.) de 6 mg/kg de escitalopram no tempo 0 da experiência, tendo-se seguido uma administração contínua i.v. de 4 mg/kg por hora. Foram administrados o “*veículo*” (i.v.) e CsA (intra-arterial) aos 120 minutos após o início da experiência, 2 ml/kg e 25 mg/kg, respetivamente. Ao longo da experiência foram retiradas amostras de plasma entre os 10 e os 220 minutos após a administração de escitalopram, assim como amostras em microdiálise de 20 em 20 minutos. No final, aos 220 minutos, os

ratos foram eutanaziados e retiradas amostras de cérebro. Verificou-se que não houve diferenças significativas entre os grupos relativamente à farmacocinética do escitalopram ao nível plasmático, indicando que o inibidor da P-gp não teve efeitos na farmacocinética do escitalopram. No entanto, verificou-se, um aumento da concentração de escitalopram no tecido cerebral no grupo tratado com inibidor da P-gp, comparativamente ao grupo controlo. Verificou-se, igualmente, o aumento da concentração de escitalopram em amostras de microdiálise. Estes resultados demonstram que **a inibição da P-gp** leva a **alterações** no transporte de escitalopram ao nível da BHE. Para os estudos de farmacodinâmica foram utilizados 67 ratos C57BL/6JOlaHsd machos, com 6-8 semanas de idade. Estes foram mantidos durante 5 a 7 dias em aclimatização, e de seguida pré-tratados com verapamilo (Ver) 20 mg/kg (i.p) ou solução salina uma hora antes da administração i.p. de escitalopram (0,1 ou 1 mg/kg). Trinta minutos após a segunda injeção os animais foram suspensos individualmente pela cauda, tendo sido posteriormente analisados os resultados. Percebeu-se que o pré-tratamento com o inibidor, Ver, aumentou a resposta ao antidepressivo em ambas as concentrações testadas. Este resultado reforça a hipótese de que a estratégia de inibição da P-gp pode facilitar o aumento dos efeitos centrais do escitalopram, enquanto evita os efeitos secundários associados a doses elevadas do mesmo. No entanto, esta estratégia pode causar efeitos adversos, devido à acumulação do antidepressivo. Desta forma, uma estratégia para reduzir o risco do surgimento destes efeitos seria utilizar este tipo de tratamento em indivíduos com níveis elevados de P-gp e doses não elevadas de antidepressivo. Consequentemente, ocorreria uma normalização dos níveis de fármaco no cérebro, ou seja, não haveria uma acumulação excessiva do antidepressivo, evitando, assim, a acumulação de concentrações tóxicas no cérebro. Assim, percebe-se que o **uso de inibidores é uma potencial estratégia para aumentar a eficácia de tratamentos com antidepressivos** (O'Brien et al., 2013).

Como referido no capítulo anterior, as doenças de Parkinson e Alzheimer estão relacionadas com a diminuição da expressão e/ou atividade da P-gp ao nível do SNC (Abuznait et al., 2011; Kortekaas et al., 2005) Deste modo, o uso de compostos com capacidade de **aumentar a expressão e/ou atividade da P-gp podem ser vistos como potenciais estratégias no tratamento de pacientes com estas doenças**, ao diminuir,

por exemplo, a acumulação do AB a nível cerebral, retardando potencialmente o avanço da doença de Alzheimer.

1.2.7.6. Importância da modulação da P-gp na barreira intestinal

Como referido no presente capítulo, a P-gp tem um papel essencial na barreira intestinal, limitando a absorção de diversos compostos endógenos e xenobióticos. Como tal, tornou-se extremamente relevante compreender de que modo a modulação da P-gp afetaria a absorção de compostos substratos da P-gp.

Adicionalmente, sabendo que muitas intoxicações por substratos da P-gp resultam da ingestão acidental ou intencional dos mesmos, o mecanismo fisiológico protetor mediado pela P-gp é particularmente relevante a nível intestinal, reduzindo significativamente a absorção intestinal de compostos potencialmente nocivos e, conseqüentemente, limitando o seu acesso aos órgãos/tecidos alvo.

Com esse fim foram realizados diversos estudos *in vitro*, com células Caco-2, as quais mimetizam as características dos enterócitos do intestino delgado, em que se testou a capacidade moduladora de novos compostos de síntese, como tioxantonas quirais, derivados tioxantónicos, xantonas dihidroxiladas e xantonas oxigenadas. Demonstrou-se em todos os estudos (alguns já descritos anteriormente) que derivados destes grupos químicos eram ativadores e/ou indutores da P-gp e que promoviam o efluxo de PQ, ou seja, promoviam o aumento da sua excreção (Lopes et al., 2018; Martins et al., 2019; Silva et al., 2015a; Silva et al., 2014b). Assim, percebe-se que **ativadores e indutores da P-gp**, promovem a **excreção de substratos** da proteína a nível intestinal, como é o caso do PQ, **limitando a sua absorção**.

Por outro lado, do ponto de vista farmacológico, fármacos existentes na terapêutica e que são substratos da P-gp podem ser administrados por via oral e, a nível intestinal, têm a sua farmacocinética e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade, limitada pela P-gp presente na membrana apical dos enterócitos. Deste modo, a **inibição da P-gp a nível intestinal** pode representar uma estratégia

para aumentar a sua absorção intestinal e, conseqüentemente, a sua eficácia terapêutica.

Foi realizado um estudo em que se pretendia avaliar a influência da P-gp na absorção intestinal de afatinib, um anticancerígeno (Zhang et al., 2018). Foram realizados ensaios *ex vivo* em ratos, com administração oral de afatinib (4 mg/kg) com ou sem Ver (14 mg/kg), uma semana antes dos ensaios. Foram recolhidas amostras de sangue (150 µL) via jugular, entre 5 min e 24 h, após início do ensaio. Estudos *in situ*, foram realizados com uma única passagem por perfusão intestinal, tendo-se criados dois grupos doseados com (1) afatinib (0.1 mM) e (2) afatinib (0.1 mM) + Ver (0.2 mM), e coletadas amostras de sangue venoso entre 5 e 60 minutos após dosagem. Os resultados destes ensaios sugerem que aquando administração simultânea, via oral, de Ver e afatinib, o Ver altera a farmacocinética do afatinib, existindo, por isso, interação entre estes dois fármacos. Foram, também, realizados ensaios *in vitro* de uptake usando células Caco-2, onde se incubou afatinib (2 µM) com ou sem dois inibidores da P-gp, a CsA (50 µM) ou o Ver (50 µM), durante 1 h. Nestes estudos *in vitro* verificou-se um aumento significativo da absorção de afatinib na presença de ambos os inibidores, não se tendo observado diferenças significativas entre os valores de absorção entre inibidores. Assim, na **presença de inibidores da P-gp a nível intestinal**, verifica-se um **aumento da absorção** e, conseqüente, uma **diminuição da excreção** de compostos que são **substratos** da P-gp (Zhang et al., 2018).

1.2.8. A P-gp e as suas Implicações Forenses

A P-gp possui, tal como referido anteriormente, um elevado espetro de substratos, entre os quais antidepressivos, antiarrítmicos, antipsicóticos, analgésicos, entre outros (Sharom, 2008) (**Tabela 2**). Como tal, a sua modulação (indução/ativação e inibição) torna-se relevante ao poder interferir com a eficácia terapêutica dos mesmos. Este tema começou a despertar interesse na comunidade científica, tendo-se começado por realizar estudos de modo a avaliar se os polimorfismos do gene *ABCB1* que interferem com a sua expressão e atividade, estariam relacionados com casos de

suicídios, ineficácia de tratamentos com antidepressivos, analgésicos, entre outros, ou mesmo relacionados com casos de intoxicações.

Para este efeito, foi realizado um estudo em que se analisou, em autópsias forenses, a hipótese de existir uma associação entre polimorfismos (1199G>A, 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T) do gene *ABCB1* e o fenómeno de suicídios. Para tal, foram avaliadas 1012 autópsias executadas em 2008, em que o sangue femoral estaria disponível e em que os testes toxicológicos teriam sido realizados. No entanto, 14 desses casos foram excluídos pelo facto de os indivíduos possuírem menos de 18 anos. Desta forma, apenas 998 casos foram estudados. Destes casos, foram excluídas as intoxicações indeterminadas do grupo de não suicídio. Foi feita a distinção entre três grupos, os suicídios, não suicídios e os suicídios violentos (estrangulamento /enforcamento /sufocamento, por tiros, instrumento cortante, entre outros), analisada a distribuição alélica comparando suicídios com não suicídios e suicídios violentos com não suicídios e, por último, foi feita uma análise com base no sexo. Nos ensaios toxicológicos verificou-se a presença de antidepressivos em 18% dos casos, antipsicóticos foram encontrados entre 1 e 3 % dos casos e, por fim, foram encontradas outras substâncias como etanol (37 % de todos os casos), paracetamol (14,7 % de todos os casos), entre outros. Nos resultados verificou-se que em 897 casos, apenas 2 eram homozigóticos para as 3 posições (3435T-2677G-1236T), demonstrando que este genótipo é raro no Canadá. Assim, foi encontrada uma associação entre a variação genética do gene *ABCB1* e o fenómeno de suicídio, sendo esta associação mais clara no subgrupo dos suicídios violentos. No entanto, quando foram divididos os suicídios violentos consoante sexo, verificou-se que só existia associação entre os polimorfismos 1236T, 3435T e 2677T em indivíduos do sexo masculino. Este resultado pode ser explicado pelo facto de 76 % das amostras serem indivíduos do sexo masculino. Neste estudo concluiu-se que existe uma maior frequência de polimorfismos 1236T, 2677T e 3435T no grupo “suicídio” em comparação ao grupo “não suicídio”, o que levou os autores do estudo a sugerirem que os **polimorfismos do gene *ABCB1* estão associados ao aumento do risco de cometer suicídio** (Boiso Moreno et al., 2013).

1.2.8.1. P-gp e antidepressivos

A baixa eficácia dos **antidepressivos no tratamento de alguns pacientes** originou a realização de diversos estudos, que passaremos a descrever, para analisar a hipótese desta ineficácia farmacológica estar relacionada com a presença de polimorfismos do gene *ABCB1*.

O estudo de Karlsson et al. (2013) torna-se extremamente relevante ao tentar perceber se existe uma correlação entre a existência de polimorfismos do gene *ABCB1* e a ocorrência de intoxicações fatais envolvendo venlafaxina e citalopram. Para este efeito, foram selecionados, do Departamento de Genética e Toxicologia Forense da Suécia, 228 casos positivos nos exames toxicológicos de pesquisa para venlafaxina e citalopram (116 e 112 casos, respetivamente), tendo sido realizada a genotipagem para polimorfismos do gene *ABCB1*. Para além disso, durante os procedimentos, foram realizados novos testes toxicológicos de pesquisa para fármacos que são substratos da P-gp e etanol. Posteriormente, os casos foram divididos em 2 grupos, intoxicações (73 casos), incluindo suicídios, acidentes e indeterminado, e casos não relacionados com intoxicações (155 casos). Foram fornecidas para o estudo informações relativas à idade, sexo e outras informações relacionadas com a morte. Verificou-se uma associação entre os polimorfismos 1236T e 3435T do gene *ABCB1* e intoxicações com venlafaxina. No entanto, isto não se verificou para o citalopram, o que sugere que os efeitos das variações genéticas podem estar associados com um substrato específico. Dos indivíduos com polimorfismos 1236T, 2677T e 3435T, 70 % cometeram suicídio, e nenhum foi associado com intoxicação. Isto pode estar relacionado com falta de efeitos do tratamento com este antidepressivo. Em indivíduos homozigóticos para apenas um polimorfismo, 2 cometeram suicídio por intoxicação, um acidental e outro indeterminado, estando, em todos os casos, a concentração de venlafaxina bastante acima do valor terapêuticamente recomendado. Assim, pelos resultados observados, percebe-se que nos casos analisados, os **polimorfismos C1236T e C3435T diferem entre intoxicações e não intoxicações**, o que possibilita **inferir a relação dos polimorfismos com a atividade da P-gp. Os referidos polimorfismos poderão induzir o risco de intoxicação**, por acumulação excessiva de venlafaxina no cérebro, ou levar a

efeitos terapêuticos indesejados, devido ao efluxo excessivo e consequente decréscimo da concentração de fármaco no SNC (Karlsson et al., 2013).

O estudo de Rahikainen et al. (2018) foi realizado com o objetivo de perceber se os polimorfismos do gene *ABCB1* estavam ligados a casos de suicídios. Para tal, foram incluídas amostras de 633 autópsias médicas realizadas no Departamento de Medicina Legal da Universidade de Helsínquia entre 1998 e 2013. De todos os casos selecionados, 349 foram de suicídio (grupo em estudo) e 284 de controlos (forma de morte diferente de suicídio). Todos os casos deram resultados positivos para o antidepressivo citalopram nas análises toxicológicas *post-mortem*. Na maioria dos casos, na análise toxicológica *post-mortem*, para além do citalopram, foram encontradas 23 outras substâncias (como digoxina, morfina, quinidina, hidroxizina, etc.) e álcool, tendo apenas sido tomado em conta os substratos da P-gp. O grupo em estudo continha 165 indivíduos do sexo feminino e 184 do sexo masculino, enquanto que grupo controlo englobava 159 mulheres e 125 homens. O grupo de estudo foi dividido em suicídios não violentos e suicídios violentos, que incluíam intoxicação e outras causas, respetivamente. Verificou-se uma associação entre os polimorfismos 1236T, 2677T e 3435T e os suicídios não violentos em indivíduos do sexo feminino que consumiam citalopram, quando comparado com o grupo controlo. No entanto, não foi encontrada uma associação entre estes polimorfismos e os suicídios violentos em nenhum dos sexos. Também se verificou que estes polimorfismos não interferiam significativamente com a resposta ao tratamento com citalopram. No entanto, estes polimorfismos parecem contribuir para uma resposta adversa quando há uma ingestão de citalopram conjuntamente com outros fármacos, especialmente em mulheres. Assim, este estudo permite concluir que os três principais polimorfismos do gene *ABCB1* possuem um **papel importante nas reações adversas a fármacos, resultante de interações medicamentosas**, mostrando que **há um risco superior de intoxicação em indivíduos do sexo feminino portadores destes polimorfismos** (Rahikainen et al., 2018).

Em conclusão pela análise dos estudos previamente referidos, parece ocorrer uma associação entre os polimorfismos mais comuns do gene *ABCB1* e os efeitos adversos em tratamentos com alguns antidepressivos. Isto pode ser explicado pelo facto destes polimorfismos poderem interferir com a atividade e expressão da P-gp

(Fujii et al., 2012; Hodges et al., 2011; Hoffmeyer et al., 2000), por alguns antidepressivos serem reportados como substratos da P-gp (Gameiro et al., 2017) e pela existência de interações medicamentosas (Rahikainen et al., 2018). A toma de um medicamento com capacidade moduladora (inibidor ou indutor/ativador) da P-gp em conjunto com um antidepressivo, poderá promover alterações no efluxo dos antidepressivos e, conseqüentemente, nas concentrações do mesmo no SNC. No caso de um **inibidor**, este irá promover uma **acumulação excessiva** do antidepressivo no SNC, podendo em casos extremos levar a uma **intoxicação**. Se o fármaco a ser tomado em simultâneo for um **ativador/indutor** vai **ocorrer um aumento do efluxo** do antidepressivo e, conseqüentemente, uma redução da sua concentração no alvo terapêutico, levando à sua **ineficácia terapêutica ou à redução do seu efeito tóxico**.

1.2.8.2. P-gp e opioides

De forma a compreender a razão pela qual indivíduos medicados com **opioides, como morfina, tramadol, entre outros, não respondiam como seria esperado à medicação**, foram realizados diversos estudos, com o objetivo de analisar a hipótese de esse facto estar relacionado com a presença de polimorfismos do gene *ABCB1*.

Foi realizado um estudo relativo à influência dos polimorfismos do gene *ABCB1* no alívio da dor após administração de morfina. Para este efeito, foram utilizados dados completos de 137 pacientes que foram submetidos a terapia com morfina e monitorizados durante 2 meses. Os tratamentos foram definidos com base em protocolos *standard*, tendo em consideração o índice de massa corporal, estado de saúde, idade e nível de dor avaliado pela Escala de Classificação Numérica e pela Escala da Intensidade da Dor. Foram detetados dois tipos de resposta à morfina, consoante o polimorfismo do gene *ABCB1*, onde para alelos C/C e C/T se verificou uma resposta moderada e para alelos T/T uma boa resposta à morfina. Este facto foi explicado biologicamente através da função da P-gp, proteína que define a eficácia do efluxo de compostos, reduzindo a absorção e permeabilidade dos seus substratos, nos neurónios cerebrais. Este facto leva a crer que o gene *ABCB1* tem um papel essencial na farmacocinética dos substratos da P-gp, como é o caso da morfina. Assim, percebeu-se

que os **polimorfismos do gene ABCB1** ao influenciar a atividade da P-gp vão diminuir a eficácia terapêutica da morfina, ao reduzir a sua absorção no intestino ou ao aumentar o efluxo da mesma no endotélio cerebral. Este estudo mostrou a relevância em genotipar pacientes, ao permitir prever a resposta aos tratamentos e ao permitir uma maior individualização da terapêutica. Deste modo, pode-se evitar tratamentos inadequados aos pacientes e, ao mesmo tempo, evitar a sobredosagem com substratos desta bomba de efluxo (Campa et al., 2008).

Foi realizado um estudo semelhante ao anterior, em que um dos grupos em estudo consistia em pacientes com idade igual ou superior a 18 anos que tinham feito uma histerectomia abdominal (40 casos), e o outro grupo consistia num conjunto de autópsias (196 casos) realizadas entre junho de 2008 e maio de 2009, as quais apresentavam morfina nas análises toxicológicas realizadas no sangue periférico, tendo-se procedido à genotipagem das amostras. Verificou-se que as concentrações de morfina eram significativamente menores em pacientes homozigóticos para 1236T, 2677T e 3435T, quando comparado com outros polimorfismos. Apesar de se ter observado uma concentração de morfina mais elevada para pacientes com os polimorfismos 2677T e 3435T, estas diferenças não foram significativas. Neste estudo, com base na análise dos resultados, apenas se pode afirmar que **30 % das variações nas concentrações de morfina podem ser explicadas pelos efeitos conjuntos dos polimorfismos**. Nas amostras derivadas de autópsias, verificaram-se valores 3 vezes superiores de morfina comparativamente às amostras dos pacientes. Estes resultados são justificados pelo facto das autópsias terem sido bastantes heterogéneas, não havendo a garantia de que a morfina detetada seja derivada do consumo da mesma, ou do consumo de codeína, etilmorfina e heroína, visto que a morfina é um metabolito destes compostos (Bastami et al., 2014a).

O tramadol é um opioide amplamente usado no tratamento da dor. No entanto, é bastante comum o paciente desenvolver um comportamento aditivo a esta substância após o tratamento. Para além disso, é uma das substâncias mais comumente encontradas em casos de morte de indivíduos com comportamentos aditivos como resultado de sobredosagem acidental (Shadnia et al., 2008). Devido à relevância forense deste composto, foi realizado um estudo com base na interferência de determinados polimorfismos na farmacodinâmica e farmacocinética deste

composto. Para tal, foram recrutados 20 voluntários saudáveis, onde apenas 19 terminaram o estudo, sendo 9 indivíduos do sexo masculino e 10 do sexo feminino, com uma média de 25,4 anos. Foi tido em consideração todos os aspetos demográficos dos indivíduos, assim como a medicação que tomavam. Posteriormente, os indivíduos foram divididos em 2 grupos, consoante a concentração de tramadol administrada oralmente, 50 mg ou 100 mg. Seguidamente, foram retiradas amostras de sangue dos indivíduos de 30 em 30 min até as 4 h após a ingestão, passando posteriormente a ser recolhidas amostras de hora a hora. A partir das 8 h de ingestão, as recolhas deixaram de ser regulares, tendo sido recolhidas entre 10 e 72 h depois. Verificou-se que no grupo ao qual foi administrado tramadol na dose de 50 mg houve uma associação significativa entre os polimorfismos do gene *ABCB1*, 3435T, 2677T e 1236T, e o valor de AUC (*area under the curve*) da curva de concentração vs. tempo, onde o valor de AUC da curva foi superior em indivíduos homozigóticos para estes polimorfismos. No entanto, no grupo ao qual foi administrada uma dose de 100 mg não houve uma associação significativa entre os polimorfismos do gene *ABCB1* e o valor de AUC da curva de concentração vs. tempo. Ou seja, **foi encontrada uma associação entre a farmacocinética do tramadol e os polimorfismos do gene *ABCB1*** (Bastami et al., 2014b).

Assim como no caso dos antidepressivos, verificou-se pelos estudos acima descritos, que houve uma associação entre os polimorfismos mais comuns do gene *ABCB1* e a ineficácia terapêutica em indivíduos medicados com opioides. Este facto pode ser explicado pelo facto de estes polimorfismos terem a capacidade de interferir com a atividade e/ou expressão da P-gp e, conseqüentemente, com o efluxo de alguns opioides que já se encontram descritos como substratos da P-gp (Sharom, 2008). Também pode ser justificado pela existência de eventuais interações medicamentosas, visto que os valores de expressão e atividade já vão ser distintos do normal, devido aos polimorfismos, e ao ingerir-se um medicamento com capacidade moduladora (ativador/indutor ou inibidor) da P-gp em conjunto com o opioide/ antipsicótico/ antidepressivo, vão promover alterações mais acentuadas no efluxo do mesmo. No caso de administração simultânea de um **ativador/indutor**, vai ocorrer um **efluxo excessivo do opioide** e, conseqüentemente, a sua **ineficácia terapêutica**. Por outro lado, a administração de um **inibidor** iria levar à **redução acentuada do efluxo** do

opioide e, conseqüente, à sua **acumulação** no organismo, podendo em casos extremos levar a uma **intoxicação** (Linnet and Ejsing, 2008).

Assim, compreende-se a relevância da P-gp ao nível da toxicologia forense, podendo, com uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à sua interação com diversos compostos, **melhorar a eficácia dos tratamentos com antidepressivos e antipsicóticos**, e **reduzir** o número de casos extremos como **suicídios, homicídios ou intoxicações** (Bastos and Galante, 1976; Belli et al., 2010; Boiso Moreno et al., 2013; Rahikainen et al., 2018).

1.3. Xantonas e Tioxantonas como potenciais moduladores da P-gp

A comunidade científica tem, nos últimos anos, empreendido um enorme esforço na descoberta de novos compostos com capacidade moduladora da P-gp, com o intuito de identificar potenciais fármacos com capacidade antidotal e com capacidade para reverter o fenómeno de MDR. Para esse efeito, foram sintetizados novos compostos, como derivados xantónicos, tioxantónicos e derivados da rifampicina (Paiva et al., 2013; Silva et al., 2015a; Silva et al., 2014b; Tchamo et al., 2000; Vilas-Boas et al., 2013b).

As xantonas são moléculas tricíclicas em anel, pertencentes a uma classe de heterocíclicos oxigenados. Podem ser encontradas como metabolitos secundários em plantas, líquenes, fungos e bactérias (Chae et al., 2015; Masters and Brase, 2012). As xantonas naturais podem ser subdivididas, consoante a natureza dos seus substituintes no esqueleto dibenzo- γ -pirona. Assim, estes podem variar entre xantonas oxigenadas simples, glicosiladas, xantonas preniladas e seus derivados, dímeros xantónicos, miscelâneas e xantonolignoides. Por outro lado, os derivados xantónicos de síntese podem ser criados pela adição de substituintes simples, como grupos hidroxilo, metilo, metoxilo e carboxilo, ou pela adição de substituintes mais complexos, como grupos epóxi, ácido metiltiocarboxílico, metilidenebutirolactona, aminoálcool, sulfamoil e dihidropiridina no seu esqueleto. Estes dois grupos de

Introdução

derivados xantônicos têm em comum o esqueleto de base xantônica (Figura 5) (Pinto et al., 2005; Shan et al., 2011).

As xantonas possuem **propriedades antioxidantes, anticancerígenas, anti-inflamatórias, anti-alérgicas, antibacterianas, antifúngicas e atividade antiviral** (Pinto et al., 2005; Shan et al., 2011). O potencial quimiopreventivo e as propriedades quimioterapêuticas das xantonas estão associadas ao seu potencial inibidor em diversos processos da carcinogênese, como é o caso da inibição de quinases, ciclooxigenases, redutases ribonucleicas e polimerases de DNA (Shan et al., 2011). As suas propriedades anticancerígenas estão altamente associadas com o seu esqueleto tricíclico, e são altamente dependentes da natureza/posição dos diferentes substituintes (Chae et al., 2015). Estes compostos têm sido descritos como **ativadores ou indutores da P-gp** em diversos estudos, e conseqüentemente **associados a potenciais vias antidotais** (Martins et al., 2019; Silva et al., 2014b; Silva et al., 2015b). No entanto, alguns derivados xantônicos têm igualmente sido descritos como **potenciais inibidores da P-gp**, podendo interferir com a ligação do ATP à proteína, e desta forma serem utilizados como **potenciais fármacos para reverter o fenômeno de MDR ou promover a acumulação no SNC de compostos usados na terapêutica** (Tchamo et al., 2000).

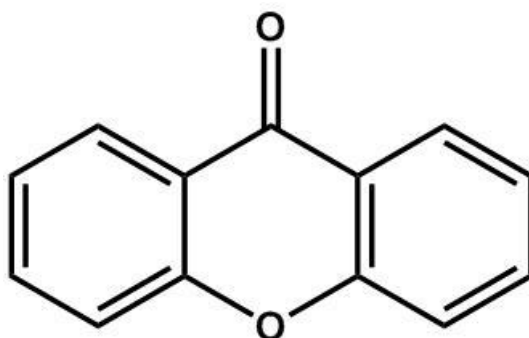


Figura 5: Estrutura química do esqueleto das Xantonas (estrutura obtida do programa *Chemdraw Professional 16.0*)

As tioxantonas são S-heterociclos com um esqueleto de dibenzo-γ-tiopirona (Figura 6) e são uma classe importante de moléculas que apresentam propriedades biológicas interessantes, nomeadamente atividade anti-tumoral (Palmeira et al., 2012b). O esqueleto das tioxantonas é bastante semelhante ao de outros compostos que desempenham um papel relevante na síntese e descoberta de novos compostos

fisiologicamente/ farmacologicamente ativos, como é o caso das xantonas, referidas anteriormente. As tioxantonas são normalmente sintetizadas via intermediários do tipo benzofenonas, diariltioeter ou diariltioester. O processo a utilizar na sua síntese é dependente da posição em que se pretende adicionar o substituinte no esqueleto da tioxantona, podendo-se sintetizar tioxantonas simples ou complexas, consoante o tipo de substituinte que se adiciona (Paiva et al., 2013).

Novos compostos tioxantónicos sintetizados possuem **atividade anticancerígena** (Palmeira et al., 2012b), **antialérgica** (Lory et al., 2007), **antibiótica** (Paiva et al., 2013) e funcionam como **inibidores da monoamina oxidase (MAO)** (Harfenist et al., 1997). Num outro estudo foi descrito que a estrutura das tioxantonas lhes permitia serem **duplos ligandos promissores**, ou seja, com a adição de determinados substituintes as mesmas poderiam desempenhar uma dupla função, como é o caso das aminoalquiltioxantonas, que constituem uma classe com dupla atividade, funcionando como **inibidores do crescimento celular e inibidores da P-gp** (Palmeira et al., 2012b).

Algumas novas tioxantonas sintéticas foram descritas como **ativadores e/ou indutores da P-gp** (Lopes et al., 2018; Silva et al., 2015a; Silva et al., 2014b), enquanto outras foram reportadas como **inibidores da P-gp** (Paiva et al., 2013). Assim, dependendo do substituinte, podem ser **potenciais antídotos** (caso de ativadores e/ou indutores), **ou potenciais agentes para reversão do fenómeno de MDR ou, alternativamente, potenciais promotores de uma maior acumulação intracelular de fármacos**, como antidepressivos, antipsicóticos ou opioides terapêuticos, no SNC, aumentando a sua eficácia terapêutica (casos dos inibidores da P-gp).

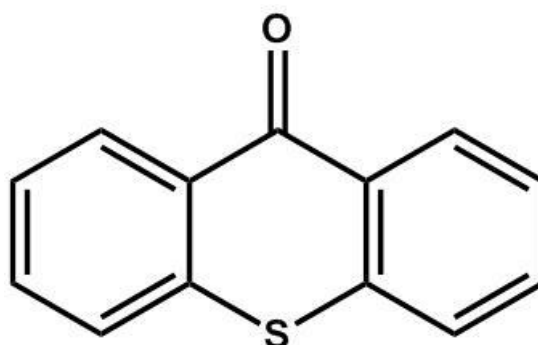


Figura 6: Estrutura química do esqueleto das Tioxantonas (estrutura obtida do programa Chemdraw Professional 16.0).

Introdução

Pelo descrito anteriormente, torna-se mais evidente a relevância que estes compostos possuem, tanto ao nível da potencial reversão fenómeno de MDR no tratamento do cancro ou de outras patologias, promovendo, o aumento da acumulação de compostos utilizados na terapêutica e aumentando, assim, a sua eficácia terapêutica, quer ao nível do tratamento de intoxicações com substratos tóxicos da P-gp, podendo representar novas estratégias antidotais, aumentando a eliminação desses compostos e, conseqüentemente, reduzindo a sua toxicidade. Deste modo, torna-se imperativo um conhecimento mais aprofundado da química destes compostos e dos mecanismos pelos quais estes interagem com a P-gp, com o objetivo de permitir estabelecer relações estrutura-atividade para o desenvolvimento de compostos mais potentes, seletivos, menos propensos a interações medicamentosas e, se possível, desprovidos de toxicidade.

II. Objetivos do **trabalho**

2. Objetivos do Trabalho

Considerando o importante papel fisiológico da P-gp na eliminação de compostos tóxicos, assim como o seu relevante papel na farmacocinética de diversos fármacos, o objetivo principal do presente trabalho é identificar novos compostos com a capacidade de aumentar a expressão e/ou atividade da P-gp e, assim, representarem potenciais estratégias antidotais em intoxicações causadas por substratos tóxicos desta proteína; ou, alternativamente, identificar novos compostos com potencial inibitório da P-gp e, portanto, potenciais estratégias terapêuticas a utilizar na reversão do fenómeno de MDR. Para este propósito, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Avaliar os efeitos de 5 novos derivados xantónicos (**X1, X4, X5, X6 e X7**) e 10 novos derivados tioxantónicos (**Tx1, Tx2, Tx3, Tx4, Tx5, Tx6, Tx7, Tx8, Tx9 e Tx10**) na expressão e atividade da P-gp, em células Caco-2. Para o efeito, estudos preliminares de avaliação da citotoxicidade dos compostos serão efetuados em células Caco-2, 24 h após exposição, de forma a selecionar concentrações não citotóxicas dos compostos em estudo.

- ✓ Com base nos resultados obtidos na avaliação anterior, pretende-se avaliar o potencial dos novos derivados xantónicos e tioxantónicos para modular a citotoxicidade de substratos da P-gp. Com esse fim, a **daunorrubicina** (DAU), um antineoplásico extremamente tóxico e associado ao desenvolvimento de MDR (Silva et al., 2015b) será utilizado como substrato modelo da P-gp. A **quinidina**, um outro substrato da P-gp, será igualmente utilizada com o objetivo de verificar a existência de eventuais diferenças no efeito dos derivados xantónicos em função do tipo de substrato utilizado.

III. MATERIAIS E

MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

No presente estudo, os reagentes utilizados na cultura celular, incluíram o *Dulbecco's modified eagles médium- high glucose* (DMEM) e os a.a não essenciais (NEAA, de *non essential aminoacids*), assim como a rodamina 123 (RHO 123), zosuquidar (ZOS), brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), vermelho neutro (NR, de neutral red), Trizma® base e dimetilsulfóxido (DMSO), que foram adquiridos na Sigma (St. Louis, MO, USA). O detergente triton™ X100 foi comprado à Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). O bicarbonato de sódio foi adquirido na Merck (Darmstadt, Germany). A solução salina *Hanks' Balanced Salt solution* sem cálcio e magnésio (HBSS -/-), a solução salina *Hanks' Balanced Salt solution* com cálcio e magnésio (HBSS +/-), o soro bovino fetal (FBS), o antibiótico (10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina), 0.25% tripsina/1mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e a solução salina de fosfato (PBS -/-, *Phosphate Buffer Solution*) foram adquiridos aos Laboratórios Gibco (Lenexa, KS, USA). O anticorpo (UIC₂) conjugado com a ficoeritrina (PE) foi comprado à Abcam (Cambridge, Estados Unidos). Os reagentes utilizados no citómetro de fluxo, nomeadamente a solução de limpeza e a solução de descontaminação, foram adquiridos na BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

3.2. Xantonas e Tioxantonas

Para o presente trabalho, foram sintetizadas e disponibilizadas da biblioteca de compostos do Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica, do Departamento de Ciências Químicas, da Faculdade de Farmácia, da Universidade do Porto, **5 derivados xantónicos (X1, X4, X5, X6 e X7)** e **10 derivados tioxantónicos (Tx1, Tx2, Tx3, Tx4, Tx5, Tx6, Tx7, Tx8, Tx9 e Tx10)**. Na Figura 7 e Figura 8, estão ilustradas as estruturas químicas base dos compostos usados no presente estudo. Soluções stock dos derivados xantónicos e tioxantónicos foram preparadas em DMSO a 50 e 20 mM,

respetivamente. Todas as soluções stock foram armazenadas a -20 °C e diluídas no dia da experiência em meio de cultura celular, garantindo que a concentração de DMSO não excedeu nunca os 0,1 %.

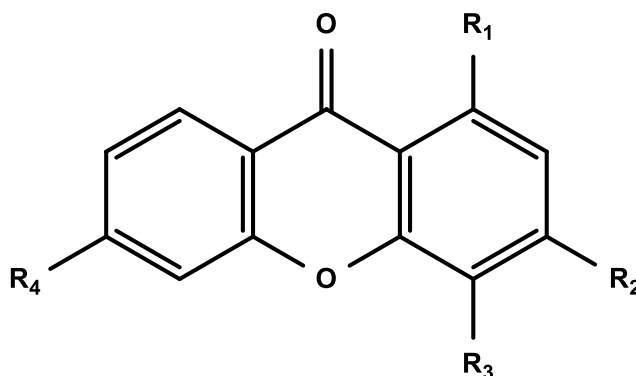


Figura 7: Estrutura química base dos derivados Xantônicos (Xs) testados no presente estudo.

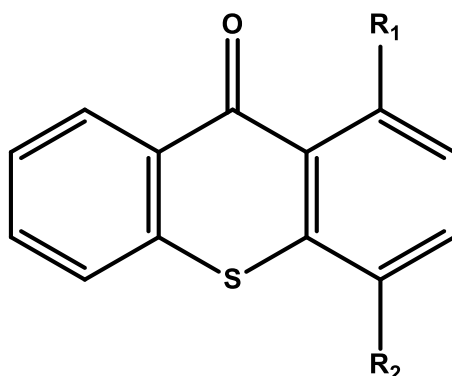


Figura 8: Estrutura química base dos derivados Tioxantônicos (Tx) testados no presente estudo.

3.3. Cultura Celular

3.3.1. Modelo celular: células Caco-2

Foram utilizadas as células Caco-2, uma linha celular humana de adenocarcinoma intestinal, as quais mimetizam as características dos enterócitos do intestino delgado (Pinto, 1983). As células crescem em monocamada, possuindo uma

forma cilíndrica polarizada. Apresentam microvilosidades na zona apical, TJ entre células adjacentes e expressam atividade enzimática de hidrólase, idêntica à existente no intestino delgado (Sambuy et al., 2005). Adicionalmente, as células Caco-2 expressam P-gp em níveis semelhantes aos encontrados no jejuno humano (Taipalensuu et al., 2001) e foram já validadas como um modelo in vitro adequado à pesquisa de moduladores da P-gp, incluindo derivados xantônicos e tioxantônicos (Lopes et al., 2018; Martins et al., 2019; Silva et al., 2011; Silva et al., 2014a; Silva et al., 2015a; Silva et al., 2014b).

As células Caco-2 foram adquiridas à *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC, UK) e foram normalmente cultivadas em frascos 75cm² usando meio de cultura DMEM com 4500 mg/L de glucose, suplementado com 3.7 g de hidrogénio carbonato de sódio (NaHCO₃), 10 % de FBS, 1 % de a.a não essenciais (NEAA), 1 % de antibiótico (para prevenir a proliferação bacteriana).

As células foram mantidas a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂ – 95 % de O₂. O meio foi mudado de dois em dois dias, de modo a providenciar melhores condições de crescimento celular. As células foram utilizadas apenas quando atingiram 80-90% de confluência. Em todas as experiências, as células foram semeadas a uma densidade de 60.000 células/cm² e utilizadas 3 dias após a sementeira, tempo necessário para se atingir a confluência. As células usadas em todas as experiências realizadas encontravam-se entre as passagens 55 e 64.

3.3.2. Tripsinização e Sementeira

As culturas de células com 80-90 % de confluência foram tripsinizadas (tripsina 0,25%/EDTA 1 mM) e semeadas de acordo com o protocolo ilustrado na Figura 9.



Figura 9: Esquema representativo do processo de tripsinização realizado quando as células se encontravam a 80-90 % de confluência.

A partir das contagens efetuadas na câmara de Newbauer, procedeu-se aos seguintes cálculos para calcular a densidade da suspensão celular obtida após tripsinização (suspensão celular A), para calcular a densidade da suspensão a usar na sementeira (suspensão celular B) e para definir como se prepararia a suspensão celular B a partir da A.

- Densidade da suspensão A:

$$Total\ de\ células = \frac{n^{\circ}\ de\ células\ contadas}{n^{\circ}\ de\ quadrantes} * 10000$$

- Densidade da suspensão B:

Densidade da sementeira= 60000 células/cm², num volume final de meio de 150 ou 500 µL consoante a sementeira seja efetuada em placas de 96 ou 24 poços, respetivamente.

✓ P₉₆ -> 0,32 cm² de área

$$x = \frac{60000\ células/cm^2 * 0,32\ cm^2}{1\ cm^2} \Leftrightarrow x = 19200\ células/poço$$

Sabendo que cada poço deverá conter 150 µL de suspensão celular procedeu-se ao cálculo da densidade da suspensão a utilizar na sementeira (Suspensão B) pela seguinte razão:

19200 células

V_{fmeio/poço}= 150 µL

x

1000 µL (=1 mL)

$$x = \frac{19200 * 1000\ µL}{150\ µL} \Leftrightarrow x = 128000\ células/mL$$

Para preparar a suspensão B a usar na sementeira de placas de 96 poços a partir da suspensão A obtida após tripsinização das células usa-se a seguinte fórmula:

*Densidade celular da suspensão A * vi = 128000 * vf ; vi = volume a usar da suspensão A; vf = volume total necessário para as placas que vão ser semeadas.*

✓ **P₂₄ -> 1,9 cm² de área**

$$x = \frac{60000 \text{ células/cm}^2 * 1,9 \text{ cm}^2}{1 \text{ cm}^2} \Leftrightarrow x = 114000 \text{ células/poço}$$

114000 células

V_{fmeio/poço} = 500 µL

x

1000 µL (=1 mL)

$$x = \frac{114000 * 1000 \text{ µL}}{500 \text{ µL}} \Leftrightarrow x = 228000 \text{ células/ml}$$

Para preparar a suspensão B a usar na sementeira de placas de 24 poços a partir da suspensão A obtida após tripsinização das células usa-se a seguinte fórmula:

*Densidade celular da suspensão A * vi = 228000 * vf ; vi = volume a usar da suspensão A; vf = volume total necessário para as placas que vão ser semeadas.*

Posteriormente aos cálculos dos volumes necessários de suspensão A para preparar a suspensão a semear, segue-se o protocolo ilustrado na **Figura 10**.

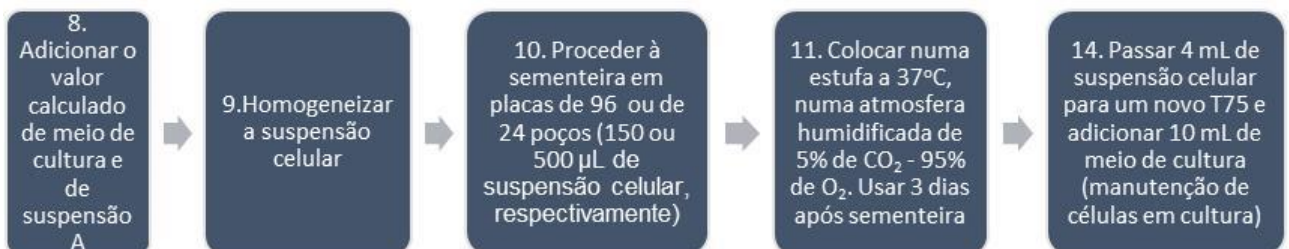


Figura 10. Esquema representativo da sementeira celular após a contagem das células.

3.4. Citotoxicidade das Xantonas e das Tioxantonas:

A citotoxicidade das xantonas e das tioxantonas (0-50 μM e 0-20 μM , respetivamente) foi avaliada em células Caco-2, pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro (NR, *de neutral red*), pelo ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), pelo ensaio de redução da resazorina (REZ) e pelo ensaio de ligação da sulforodamina B (SRB), 24 h após exposição aos compostos em estudo. Nos presentes ensaios, as células foram semeadas a uma densidade de 60000 células/cm², em placas de 96 poços e aguardou-se um período de 3 dias, de modo às mesmas ficarem confluentes. Após este período, as células foram expostas a Tx1, Tx2, Tx3, Tx4, Tx5, Tx6, Tx7, Tx8, Tx9, Tx10 (0-20 μM) e a X1, X4, X5, X6 e X7 (0-50 μM), tendo os compostos sido preparados em meio de cultura DMEM fresco no dia da experiência.

3.4.1. Ensaio de Incorporação do Vermelho Neutro (Neutral red, NR)

O ensaio de incorporação do NR é um ensaio comumente utilizado para determinar a viabilidade celular, sendo frequentemente utilizado para detetar a citotoxicidade dos compostos em estudo (Silva et al., 2015a; Silva et al., 2014b). Este ensaio fundamenta-se na capacidade das células viáveis (ao contrário das não viáveis) incorporarem, por transporte ativo, o corante NR nos lisossomas. Após incubação, aspiração do meio e lise das células, o NR incorporado é quantificado por espectrofotometria, sendo a sua absorvância proporcional ao número de células viáveis em cultura (Ates et al., 2017). No presente trabalho, os níveis de NR incorporado foram avaliados por espectrofotometria, a 540 nm, num leitor de placas (PowerWaveX BioTek Instruments, Vermont, US).

Procedimento experimental:

- Exposição das células Caco-2, semeadas em placas de 96 poços, aos compostos em estudo, com incubação durante 24 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂ – 95 % de O₂;
- 24 h após exposição, foi efetuada a aspiração do meio de cultura contendo os compostos em estudo;
- Adição de 150 µL/poço de solução de NR a 50 µg/mL (preparado em meio de cultura fresco) e posterior incubação das células durante uma hora e meia, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂ – 95 % de O₂;
- Aspiração de todos os poços após o término da incubação;
- Adição de 150 µL/poço de solução de lise [álcool etílico absoluto/água destilada (1: 1) com ácido acético a 5 %];
- Colocação das placas no agitador durante 15 min, de forma a garantir a extração e homogeneização do NR;
- Por último, a absorvância dos diferentes poços foi lida a 540 nm, num leitor de placas (PowerWaveX BioTek Instruments, Vermont, US). A percentagem de incorporação do NR em relação às células de controlo (0 µM) foi utilizada como medida de citotoxicidade.

De modo a verificar a potencial interferência da absorvância dos compostos em estudo nos valores lidos no leitor de placas, foi realizado um ensaio de “auto-absorvância”. Para o efeito, as células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços, 3 dias após sementeira expostas aos compostos em estudo durante 24 h e, posteriormente tratadas e analisadas nas mesmas condições que as placas usadas no ensaio de incorporação do NR, exceto que a incubação de 1 h e 30 minutos ocorreu em meio de cultura sem NR.

3.4.2. Ensaio de Redução do MTT

Neste ensaio colorimétrico avalia-se a redução do corante brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), a cristais de formazano azuis

insolúveis em água, pelas succinato dehidrogenases mitocondriais. O MTT atravessa a membrana celular e entra na mitocôndria onde é, então, reduzido a um composto insolúvel e colorido. Após expiração do meio, as células são solubilizadas com um solvente orgânico (ex: DMSO), sendo de seguida analisada a absorvância no leitor de placas. Como a redução do MTT só ocorre quando é metabolizado na mitocôndria de células vivas, a medição dos níveis de MTT reduzido traduz a viabilidade celular (van Tonder et al., 2015). No presente trabalho, os níveis de cristais de formazano formados foram avaliados por espectrofotometria, a 550 nm, num leitor de placas (PowerWaveX BioTek Instruments, Vermont, US).

Procedimento experimental:

- Exposição das células Caco-2, semeadas em placas de 96 poços, aos compostos em estudo, durante 24 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂ – 95 % de O₂;
- 24 h após exposição, procedeu-se à aspiração do meio de cultura contendo os compostos em estudo;
- Adição de 150 µL/poço de MTT (0,5 mg/mL, preparado em meio de cultura fresco) e posterior incubação durante 1 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂ – 95 % de O₂;
- Aspiração de todos os poços após o término da incubação;
- Adição de 150 µL/poço de DMSO para dissolver os cristais de formazano formados;
- Colocação das placas em causa no agitador durante 15 min de forma a dissolver totalmente os cristais de formazano formados;
- Por último, a absorvância dos diferentes poços foi lida a 550 nm em leitor de placas (PowerWaveX BioTek Instruments, Vermont, US). A percentagem de redução do MTT relativamente às células controlo (0 µM) foi utilizada como medida de citotoxicidade.

De modo a verificar a potencial interferência da absorvância dos compostos em estudo nos valores de absorvância lidos no leitor de placas foi realizado, tal como no

ensaio anterior, um ensaio de “auto-absorvância”. Para o efeito, as células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços, 3 dias após sementeira expostas aos compostos em estudo durante 24 h e, posteriormente, tratadas e analisadas nas mesmas condições que as placas usadas no ensaio de redução do MTT, exceto que a incubação de 1 h ocorreu em meio de cultura sem MTT.

3.4.3. Ensaio de Redução da Resazorina (REZ)

Este ensaio baseia-se no facto de, quando se expõem as células a um indicador redox, a resazorina (REZ), as células vivas têm a capacidade de o metabolizar, reduzindo-o a resorufina, que assume um tom rosado fluorescente. Os níveis produzidos de resorufina são, assim, proporcionais ao número de células viáveis em cultura (Rodriguez-Corrales and Josan, 2017). No presente trabalho, os níveis de resorufina foram avaliados por espectrometria de fluorescência a comprimentos de onda de excitação/emissão de 560/590 nm, num leitor de placas (PowerWaveX BioTek Instruments, Vermont, US). As placas utilizadas no ensaio de redução da resazorina foram posteriormente utilizadas para realizar o ensaio de ligação da sulforodamina B.

Procedimento experimental:

- Exposição das células Caco-2, semeadas em placas de 96 poços, aos compostos em estudo, durante 24 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂ – 95 % de O₂;
- Aspiração do meio de cultura contendo os compostos em estudo;
- Adição de 100 µL/poço de resazorina (10 µg/mL, preparada em meio de cultura fresco) e posterior incubação durante 1 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂ – 95 % de O₂;
- Após o período de incubação, leitura da fluorescência das placas no leitor de placas, a comprimentos de onda de excitação/emissão de 560/590 nm. A percentagem de redução da REZ relativamente às células controlo (0 µM) foi utilizada como medida de citotoxicidade;

- Preparação das placas para serem posteriormente utilizadas no ensaio de ligação da sulforodamina B:
 - Aspiração do meio de cultura presente em todos os poços;
 - Lavagem das células com 150 µL/poço de HBSS +/-, seguida de aspiração de todos os poços;
 - Fixação das células: adição de 100 µL/poço de metanol com 1 % de ácido acético e posterior congelação a -20 °C.

De modo a verificar a potencial interferência da fluorescência dos compostos em estudo nos valores lidos no leitor de placas foi realizado um ensaio de “autofluorescência”. Para o efeito, as células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços, 3 dias após sementeira expostas aos compostos em estudo durante 24 h e, posteriormente, tratadas e analisadas nas mesmas condições que as placas usadas no ensaio da redução da REZ, exceto que a incubação de 1 h ocorreu em meio de cultura sem REZ.

3.4.4. Ensaio de ligação da Sulforodamina (SRB)

Este ensaio baseia-se na propriedade do corante proteico sulforodamina B (SRB) se ligar electrostaticamente aos a.a básicos das proteínas presentes em células fixadas a pH ácido (usou-se, para o efeito, metanol com 1 % de ácido acético). A evolução cromática indica uma estimativa do total de massa proteica, alusivo ao número de células presente em cultura (Papazisis et al., 1997). A quantidade de SRB presente em cada poço é, posteriormente, avaliada por espectrofotometria, efetuando-se uma análise da absorvância a 540 nm, num leitor de placas (PowerWaveX BioTek Instruments, Vermont, US).

Procedimento experimental:

- Utilização das placas fixadas de acordo com o descrito no ensaio anterior, após um mínimo de 30 min de congelação e um máximo de 1 mês;

- Remoção do meio de fixação (metanol com 1 % de ácido acético) e secagem das placas numa estufa, a 37 °C, durante aproximadamente 15 min;
- Após secagem, adição de 100 µL/poço de SRB (0.05 %, preparada em 1 % de ácido acético) e posterior incubação, a 37 °C, durante 1 h;
- Remoção da solução de SRB;
- Lavagem das placas 4X com uma solução de ácido acético a 1 %, de modo a remover o excesso de SRB que não se ligou às proteínas;
- Colocação das placas novamente na estufa, a 37 °C, até à sua completa secagem;
- Adição de 200 µL/poço de uma solução de Trizma® base a 10 mM e agitação das placas de modo a extrair/dissolver a SRB;
- Leitura da absorvância a 540 nm num leitor de placas. A percentagem de ligação da SRB relativamente às células controlo (0 µM) foi utilizada como medida de citotoxicidade.

3.5. Estudo da Modulação da P-gp:

Foi realizado o estudo do potencial dos compostos em estudo para modular a atividade e/ou expressão da P-gp, *in vitro*, em células Caco-2. Para estes ensaios, as células foram semeadas em placas de 24 poços, a uma densidade de 60000 células/cm², realizando-se, posteriormente, os ensaios de avaliação do efeito dos compostos na atividade (ativação e atividade após 24 h de exposição) e expressão da P-gp.

Nos ensaios de avaliação da atividade da proteína usou-se Rodamina 123 (RHO 123, 10 µM) como substrato fluorescente da P-gp e Zosuquidar (ZOS, 5 µM) como inibidor específico de 3ª geração. Para o efeito, utilizaram-se dois protocolos experimentais diferentes: A) acumulação de RHO 123 na presença dos derivados xantónicos e tioxantónicos; B) acumulação de RHO 123 em células pré-expostas aos compostos em estudo durante 24 h. As concentrações de substrato e inibidor foram

definidas com base em ensaios anteriores, com resultados não publicados, nos quais se observou a ausência de citotoxicidade, após 24 h de exposição, a estes dois compostos na mesma linha celular.

O efeito dos compostos em estudo na expressão da P-gp foi avaliado por citometria de fluxo, usando um anticorpo monoclonal anti-P-gp conjugado com ficoeritrina (UIC2-PE).

De modo a verificar a potencial interferência da fluorescência intrínseca dos compostos em estudo nos valores de fluorescência da RHO 123 e do anticorpo UIC2-PE, foi previamente avaliada a sua "autofluorescência", por citometria de fluxo. Para o efeito, as células Caco-2 foram semeadas em placas de 24 poços e, três dias após sementeira, expostas aos compostos em estudo (20 μ M), durante 24 h. No final da incubação, as células foram lavadas e tripsinizadas, de modo a obter uma suspensão celular. A autofluorescência das células expostas ou não, aos compostos em estudo foi posteriormente avaliada nos filtros 530 ± 15 nm (detetor FL1, usado na análise da RHO 123) e 585 ± 40 nm (detetor FL2, usado na análise do UIC2-PE). O logaritmo da fluorescência intracelular foi registado com base na aquisição de dados de pelo menos 20.000 células. O parâmetro utilizado para comparação foi a média da intensidade de fluorescência (MFI).

3.5.1. Ensaio de acumulação da RHO 123 na presença dos derivados xantónicos e tioxantónicos - Ensaio de Ativação

O objetivo deste ensaio é detetar efeitos imediatos dos compostos em estudo na atividade da P-gp, como resultado da ativação/inibição direta da proteína. Assim, a fluorescência da RHO 123 intracelular detetada resulta da ativação/inibição direta da P-gp, sem a contribuição do aumento ou diminuição da expressão da mesma, devido ao curto período de incubação de 90 min com os compostos em estudo e o substrato fluorescente (Silva et al., 2015a; Silva et al., 2014b). Para o efeito, as células Caco-2 foram expostas, em triplicado, a uma concentração não citotóxica dos compostos em estudo (20 μ M, preparados em meio de cultura) ou meio de cultura (controlo), e RHO

123 (10 μM), na presença ou ausência de ZOS (5 μM). O esquema de exposição está representado na Figura 11.

Esquema de exposição:

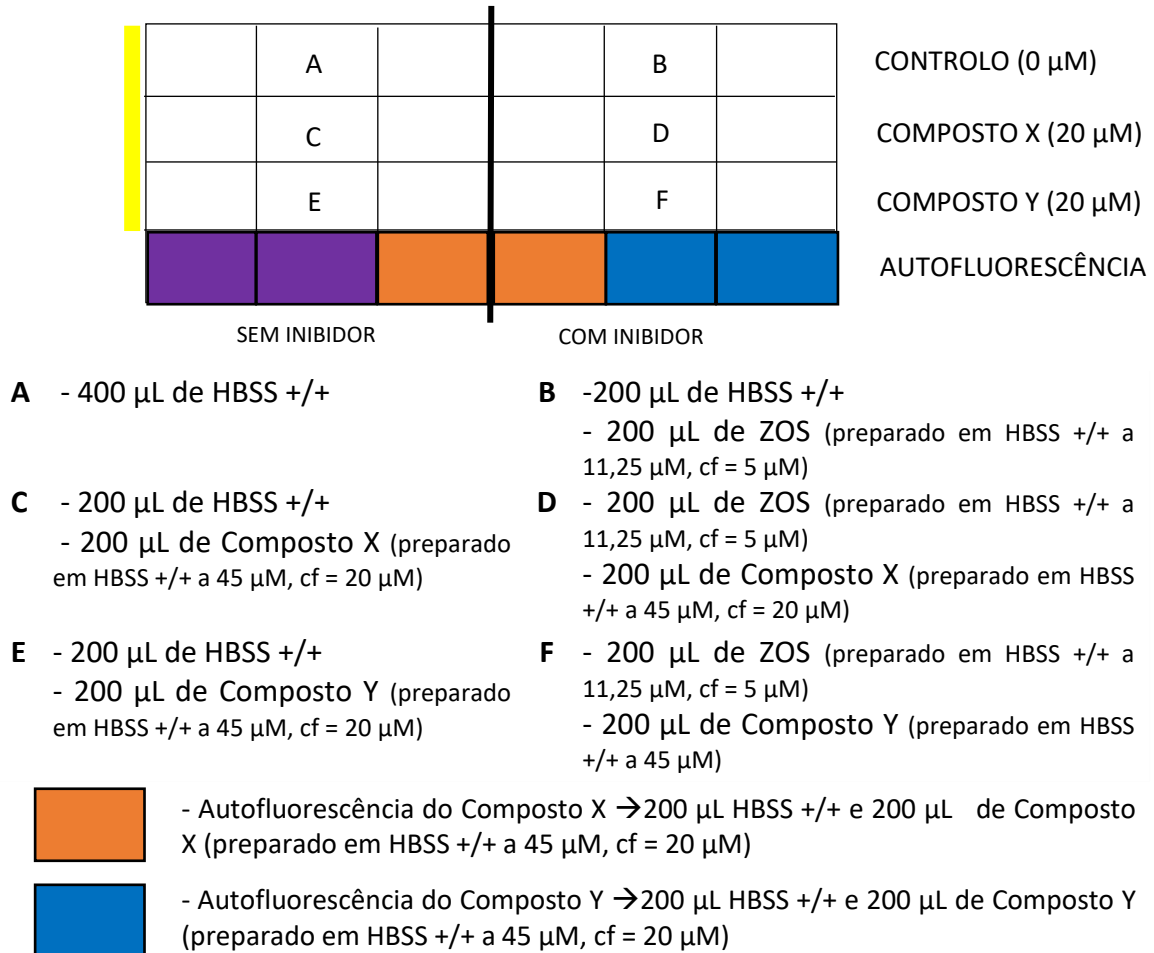


Figura 11. Esquema representativo Esquema da exposição da placa de 24 poços, no ensaio de ativação.

Procedimento experimental:

- Aspiração do meio de cultura de todos os poços da placa de 24 poços;
- Adição das soluções seguindo o esquema descrito anteriormente (Figura 11) e pré-incubar durante 30 minutos, a 37 $^{\circ}\text{C}$, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO_2 – 95 % de O_2 ;
- Adição, após o período de pré-incubação, de 50 μL de RHO 123 (preparada em HBSS +/+ a 90 μM , cf = 10 μM) às 3 primeiras linhas e incubar 90 minutos, a 37 $^{\circ}\text{C}$, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO_2 – 95 % de O_2 ;

- Após incubação, aspiração do meio contendo RHO 123 e lavar 2x com HBSS +/-;
- Adição de 500 µL de Triton x100 a 0,1 % e incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente (lise celular e libertação da RHO 123 intracelular);
- Leitura da fluorescência no leitor de placas a comprimentos de onda de excitação e emissão de 485/20 e 528/20 nm, respetivamente; a fluorescência foi expressa em intensidade de fluorescência (IF);
- A relação entre a IF na presença de ZOS [(acumulação inibida de RHO 123 com ZOS (AI)] e a IF da acumulação não inibida de RHO 123 (acumulação normal, AN) foi o parâmetro utilizado para comparação, e os resultados foram expressos como percentagem de células de controlo (0 µM) (Equação 1).

$$\text{Acumulação de Rho123} = \frac{\text{IF da acumulação de RHO 123 com inibição da P-gp (AI)}}{\text{IF da acumulação da RHO 123 em condições normais (AN)}}$$

Equação 1. Atividade da P-gp avaliada pela razão entre a quantidade de RHO 123 acumulada na presença do inibidor (5 µM, ZOS) e a quantidade de RHO 123 acumulada na ausência de inibição da P-gp. IF -intensidade da fluorescência.

3.5.2. Ensaio de acumulação de RHO 123 em células pré-expostas aos derivados xantónicos e tioxantónicos durante 24 horas - Ensaio de Atividade 24 h

O objetivo deste ensaio é detetar alterações na atividade da P-gp resultantes de eventuais alterações na expressão da proteína. Ao contrário do anterior, este possui um tempo de pré-exposição aos compostos de 24 h, sendo o esquema abaixo ilustrado representativo da exposição realizada no dia da realização da avaliação da atividade da P-gp (Figura 12). Por este facto, os valores de fluorescência da RHO 123 intracelular observados serão representativos de potenciais alterações na atividade devidas a alterações na expressão da P-gp causadas pelos compostos em estudo (Silva et al., 2014b).

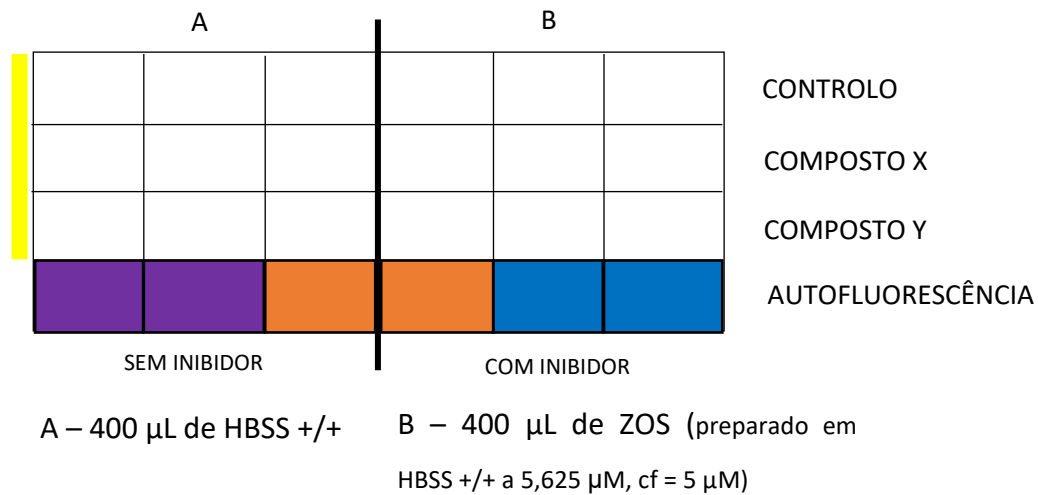
Esquema de exposição (após pré-exposição aos compostos durante 24 h):

Figura 12. Esquema representativo da exposição e posterior tratamento das placas no ensaio de atividade após pré-exposição aos compostos durante 24 h.

Procedimento experimental:

- Exposição dos compostos em estudo, a 20 μM , nos poços representados na Figura 12 e incubar durante 24 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO_2 – 95 % de O_2 ;
- Após 24 h de exposição, aspiração dos poços e adição de HBSS+/+ e ZOS (5,625 μM , preparado em HBSS+/+) como indicado no esquema da Figura 12, e pré-incubar durante 30 min a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO_2 – 95 % de O_2 ;
- Após a pré-incubação, adição de 50 μL de RHO 123 (preparada em HBSS +/+ a 90 μM , cf = 10 μM) a todos os poços das 3 primeiras linhas e incubar, durante 90 min, a 37 °C numa atmosfera humidificada de 5 % de CO_2 – 95 % de O_2 ;
- Após incubação, aspiração do meio contendo RHO 123 e lavagem das células (2x) com HBSS +/+;
- Adição de 500 μL de Triton x100 a 0,1 % e incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente (lise celular e libertação da RHO 123 intracelular);
- Leitura da fluorescência no leitor de placas a comprimentos de onda de excitação e emissão de 485/20 e 528/20 nm, respetivamente. A análise

dos resultados foi realizada conforme descrito na seção anterior, utilizando igualmente a Equação 1.

3.5.3. Ensaio de avaliação da expressão da P-gp

Este ensaio tem como objetivo verificar se os compostos em estudo têm a capacidade de alterar a expressão da P-gp, 24 h após exposição. Deste modo, pretende-se verificar se as eventuais alterações encontradas no ensaio de atividade 24 h são devidas a uma alteração na expressão da proteína, ou se são representativas de uma alteração direta na atividade da P-gp (ativação ou inibição) causada pelo composto que ainda possa permanecer intracelularmente, mesmo após 24 h de exposição (Silva et al., 2014a). Para este efeito a exposição foi realizada de acordo com o representado na **Figura 13**.

Esquema de exposição:

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24

1,2,3,22,23 e 24 – Controlos (0 μ M - exposição apenas a meio de cultura);

4,5 e 6 – Composto A (20 μ M);

7,8 e 9 – Composto B (20 μ M);

10,11 e 12 – Composto C (20 μ M);

13,14 e 15 – Composto X (20 μ M);

16,17 e 18 – Composto Y (20 μ M);

19,20 e 21 – Composto Z (20 μ M);

Figura 13. Esquema representativo da exposição aos compostos (20 μ M) durante 24 h para a avaliação do seu efeito na expressão da P-gp.

Procedimento experimental:

- Exposição das células Caco-2 aos compostos em estudo (20 μ M) ou meio de cultura (controlo), tal como representado na Figura 13 e incubação durante 24 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂ – 95 % de O₂;
- No final do tempo de incubação, aspiração dos poços e lavagem das células com 500 μ L HBSS -/-;
- Tripsinização das células (150 μ L de tripsina a 0,25 % / EDTA 1 mM);
- Incubação durante 5 min a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂ – 95 % de O₂, para obtenção de uma suspensão celular;
- Neutralização da tripsina adicionando 500 μ L de meio de cultura;
- Homogeneização para obtenção de uma suspensão celular;
- Contagem das células na camara de NewBauer para determinação da densidade celular;
- Preparação do anticorpo em HBSS +/- com 10 % de FBS; a diluição do anticorpo utilizada nesta experiência foi aplicada de acordo com as instruções do fabricante para citometria de fluxo;
- Retirar 400 μ L de suspensão celular de cada poço e colocar em *ependorf*; reunir os volumes de suspensão celular restante dos triplicados de cada condição para avaliação da autofluorescência;
- Centrifugar os *ependorfs* preparados anteriormente (300 g, 5 min, a 4 °C) e rejeitar o meio o meio de cultura;
- Ressuspender os *pellet* em 100 μ L de HBSS +/- para as autofluorescências e 100 μ L de anticorpo preparado em HBSS +/- nos restantes;
- Incubar, protegido da luz, durante 1 h, a 37 °C, com agitação;
- Após este período de incubação, lavar as células 2x com HBSS (+/+), com centrifugações intercaladas (300 g, 5 min, a 4 °C) e manter as células em gelo até à análise por citometria de fluxo;
- Imediatamente antes da análise no citómetro, ressuspender as células em PBS (- / -);
- As medições de fluorescência de células isoladas foram realizadas com um citómetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, CA, EUA), equipado com o

software de análise FCS Express™. A fluorescência do anticorpo PE-UIC2 foi medida com um filtro de 585 ± 40 nm (detetor FL2). O logaritmo de fluorescência foi registrado e ilustrado como um histograma de parâmetro único, tendo por base na aquisição de dados de pelo menos 20.000 células. O parâmetro utilizado para comparação foi a média da intensidade de fluorescência (MIF), calculada como percentagem das células controlo (0 μ M). A autofluorescência das células (células não marcadas com anticorpo, com ou sem exposição às xantonas e tioxantonas testadas) foi igualmente avaliada em cada experiência, a fim de eliminar a sua potencial contribuição para os sinais de fluorescência analisados.

3.6. Avaliação do efeito dos compostos na citotoxicidade de substratos da P-gp

Tendo em consideração o efeito de alguns dos derivados xantónicos e tioxantónicos testados na atividade e/ou expressão da P-gp, os seus potenciais efeitos na citotoxicidade de substratos desta bomba de efluxo foram posteriormente avaliados. Para o efeito, a daunorrubicina (DAU) e a quinidina foram usados como modelo de substratos da P-gp (Sharom, 2008), e o ZOS (5 μ M) como inibidor potente de 3ª geração desta bomba de efluxo (Palmeira et al., 2012a). Estes ensaios foram apenas realizados para os compostos que demonstraram potencial modulador da P-gp nos estudos anteriores. Deste modo, se um composto é identificado como potencial inibidor da P-gp, é espectável um agravamento da citotoxicidade do seu substrato e, conseqüentemente, uma potencial estratégia na reversão do fenómeno de MDR. Por outro lado, se um determinado derivado xantónico ou tioxantónico é identificado como potencial ativador e/ou indutor da P-gp, é espectável um aumento do efluxo do seu substrato, reduzindo, assim, a sua acumulação intracelular e, conseqüentemente, a sua citotoxicidade. Deste modo, o potencial efeito modulador positivo da expressão e/ou atividade da P-gp poderá traduzir-se numa proteção celular, podendo representar uma nova estratégia antidotal em intoxicações com substratos tóxicos desta bomba de efluxo.

A avaliação do efeito dos compostos na citotoxicidade da daunorrubicina foi avaliada apenas para os compostos Tx7, X4 e X7, usando dois protocolos experimentais distintos. A avaliação do efeito dos compostos na citotoxicidade da quinidina foi avaliada apenas para os compostos X4 e X7, e usando um único protocolo experimental: exposição simultânea aos compostos em estudo (20 μM) ou ZOS (5 μM) e ao substrato da P-gp, a quinidina (0 - 200 μM).

3.6.1. Avaliação do efeito dos compostos na citotoxicidade da Daunorrubicina

A avaliação do efeito dos compostos em estudo na citotoxicidade da DAU foi efetuada, tal como referido anteriormente, usando dois protocolos experimentais distintos: 1) exposição ao substrato (0 - 100 μM) durante 4 h, seguida da sua remoção e exposição aos compostos em estudo (20 μM) ou ZOS (5 μM) durante 20 h (sem DAU); 2) pré-exposição aos compostos em estudo (20 μM) ou ZOS (5 μM) durante 24 h, seguida da sua remoção, exposição à DAU (0 - 50 μM) durante 4h e, por último, remoção do substrato e adição de meio de cultura isento de compostos; a citotoxicidade da DAU foi posteriormente avaliada 24 h após o início da exposição ao substrato (ou seja, 20 h após a remoção do substrato e substituição por meio de cultura isento de compostos). O reduzido tempo de incubação com o substrato da P-gp (4 h nos dois protocolos experimentais) teve como objetivo eliminar potenciais contribuições nos resultados obtidos do efeito da DAU na expressão da proteína, uma vez que a DAU é um conhecido indutor da P-gp (Silva et al., 2015b). Em ambos os protocolos experimentais, as células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 60000 células/cm², e usadas 3 dias após sementeira. O protocolo 1 foi realizado para os compostos Tx7, X4 e X7 (**Figura 14**), enquanto que o protocolo 2 foi apenas realizado para os para os compostos X4 e X7 (Figura 15).

Esquema de exposição Protocolo 1:

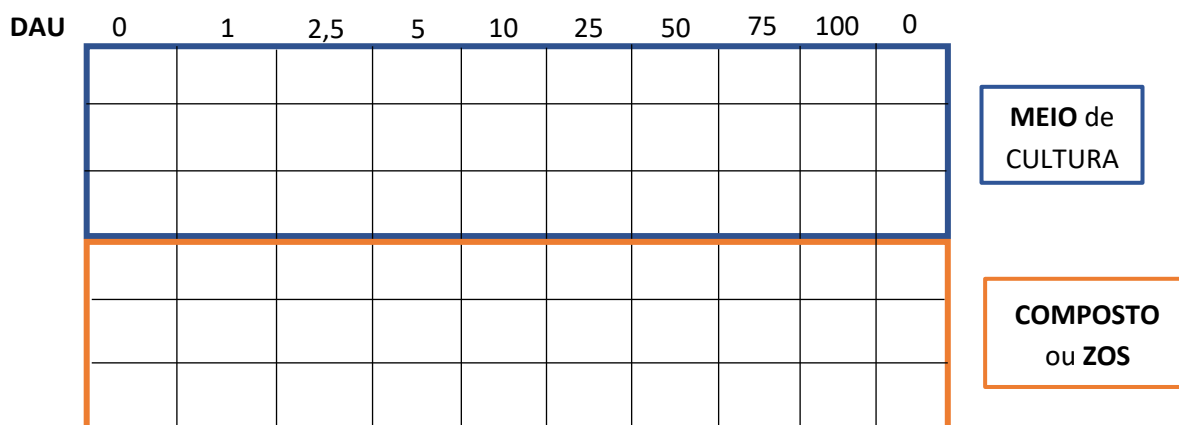


Figura 14. Esquema de exposição ao substrato (DAU) durante 4 h, seguido da sua remoção e adição de meio de cultura ou inibidor (ZOS, 5 µM) ou compostos (20 µM) em estudo (Protocolo experimental 1). A citotoxicidade da DAU é avaliada pelo ensaio de incorporação do NR 24 h após a exposição ao substrato (4 h de DAU + 20 h de compostos/ZOS).

Procedimento experimental 1:

- Aspirar o meio de cultura de todos os poços, 3 dias após a sementeira;
- Adicionar 100 µL/poço das diferentes concentrações de DAU (0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100 µM, preparadas em meio de cultura no dia da experiência), tal como indicado no esquema (Figura 14);
- Incubar durante 4 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂ – 95 % de O₂;
- Aspirar o meio de cultura de todos os poços;
- Adicionar 100 µL de meio de cultura nos poços indicados na Figura 14, assim como 100 µL de composto/ZOS;
- Incubar durante 20 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂ – 95 % de O₂;
- Após a incubação, a citotoxicidade da DAU foi avaliada pelo ensaio de incorporação do NR da seguinte forma:
 - Aspirar o meio de cultura de todos os poços;
 - Adicionar 150 µL/poço de NR (50 µg/mL em meio de cultura celular);

- Incubar durante 1 h 30 min, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO₂ – 95 % de O₂;
- No final do período de incubação aspirar todos os poços,
- Adicionar 150 µL/poço de solução de lise [etanol absoluto/água destilada (1: 1) com 5 % ácido acético] e agitar de forma a garantir a extração e homogeneização do NR;
- Ler a absorvância a 540 nm no leitor de placas (PowerWaveX BioTek Instruments, Vermont, US). A percentagem de incorporação do NR em relação às células controlo (0 µM) foi usada como medida de citotoxicidade.

No segundo protocolo experimental para a avaliação do efeito dos compostos em estudo na citotoxicidade da DAU, e ao contrário do ensaio anterior, a primeira incubação é efetuada com os compostos em estudo (X4 e X7, 20 µM) ou inibidor (ZOS, 5 µM) e, 24 h após a pré-exposição é que se procedeu à incubação com a DAU (0-50 µM). Este protocolo experimental foi apenas realizado para a X4 e X7, uma vez que foram os compostos que causaram um efeito mais significativo na atividade da P-gp, 24 h após exposição

Esquema de exposição 2:

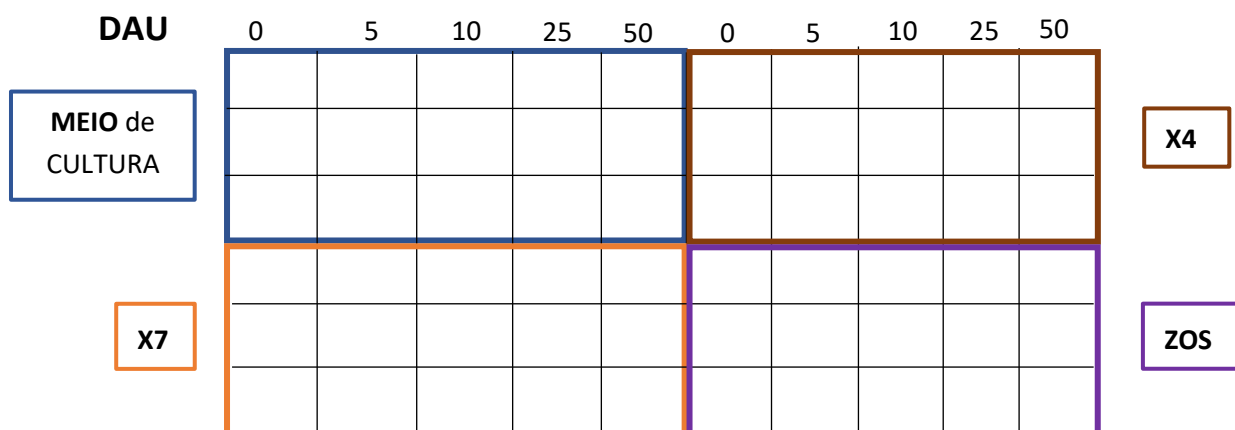


Figura 15. Esquema da pré-exposição aos compostos em estudo (X4 e X7, 20 µM) ou inibidor (ZOS, 5 µM), seguida da exposição ao substrato (DAU, 0-50 µM) durante 4 h (Protocolo experimental 2). A citotoxicidade da DAU é avaliada pelo ensaio de incorporação do NR 24 h após a exposição ao substrato (24 h de compostos/ZOS + 4 h de DAU + 20 h meio de cultura).

Procedimento experimental 2

- Aspirar o meio de cultura de todos os poços 3 dias após a sementeira;
- Adicionar 100 μL de meio nos poços indicados na Figura 15, assim como 100 μL de composto/ ZOS, preparados em meio de cultura;
- Incubar durante 24 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO_2 – 95 % de O_2 ;
- Após a pré-incubação, aspirar o meio de cultura de todos os poços;
- Adicionar 100 μL /poço das diferentes concentrações de DAU (0, 5, 10, 25, 50 μM , preparadas em meio de cultura), como indicado no esquema (Figura 15);
- Incubar durante 4 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO_2 – 95 % de O_2 ;
- Após incubação, aspirar o meio de cultura de todos os poços e adicionar 100 μL de meio em todos os poços aspirados;
- Incubar durante 20 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO_2 – 95 % de O_2 ;
- Após a incubação, a citotoxicidade da DAU foi avaliada pelo ensaio de incorporação do NR da seguinte forma:
 - Aspirar o meio de cultura de todos os poços;
 - Adicionar 150 μL /poço de NR (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em meio de cultura);
 - Incubar durante 1h 30min, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO_2 – 95 % de O_2 ;
 - No final do período de incubação aspirar todos os poços;
 - Adicionar 150 μL /poço de solução de lise [etanol absoluto/água destilada (1:1) com 5 % ácido acético] e agitar de forma a garantir a extração e homogeneização do NR;
 - Ler a absorvância a 540 nm no leitor de placas (PowerWaveX BioTek Instruments, Vermont, US). A percentagem de incorporação do NR em relação às células controlo (0 μM) foi usada como medida de citotoxicidade.

3.6.2. Avaliação da citotoxicidade da Quinidina na presença ou ausência dos compostos em estudo

Sabendo que a P-gp apresenta a capacidade de se ligar e transportar uma vasta gama de substratos, química, estrutural e farmacologicamente muito diferentes entre si, e atendendo a que o mecanismo de transporte dos seus substratos ainda não está completamente esclarecido (Silva et al., 2015b), o objetivo deste ensaio foi identificar possíveis diferenças nos efeitos dos compostos em estudo na citotoxicidade em função do substrato em estudo. Assim, a quinidina foi selecionada como modelo de substrato da P-gp, e a sua citotoxicidade avaliada pelo ensaio de incorporação do NR, com ou sem exposição simultânea aos compostos em estudo (20 μ M) ou ZOS (5 μ M) (Figura 16). Este ensaio apenas foi realizado para a X4 e X7.

Esquema de exposição:

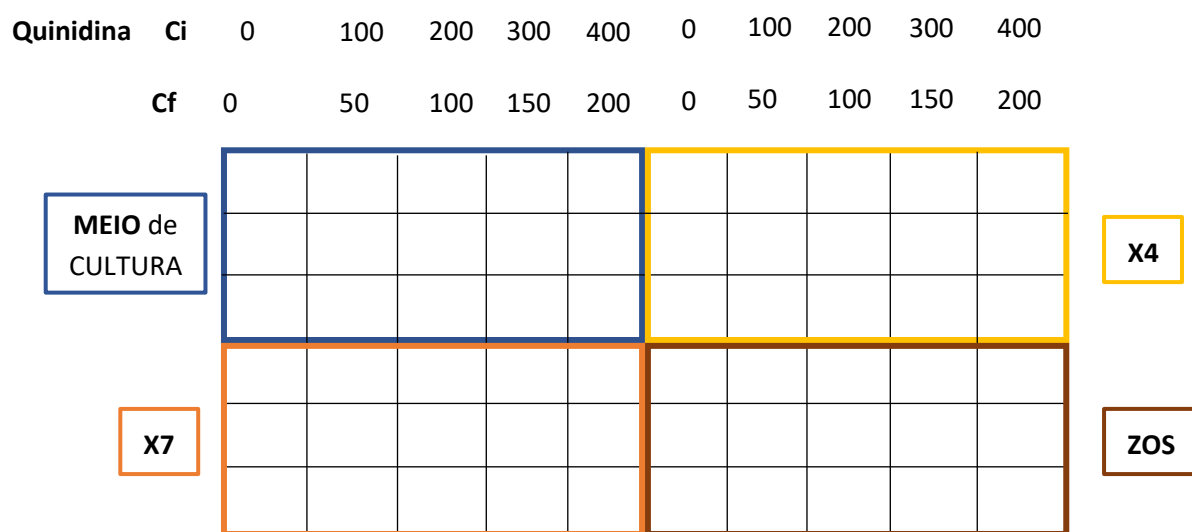


Figura 16. Esquema de exposição das células Caco-2 para avaliação do efeito dos compostos na citotoxicidade da quinidina. Ci = concentração inicial de quinidina; Cf = concentração final de quinidina.

Procedimento experimental:

- Aspirar o meio de cultura de todos os poços, 3 dias após a realização da sementeira;
- Adicionar 50 μL de meio de cultura nos poços indicados na Figura 16, assim como 50 μL de composto ou ZOS a 40 μM e 10 μM , respetivamente;
- Adicionar 50 μL das diferentes concentrações de quinidina (0, 100, 200, 300 e 400 μM) aos diferentes poços, como indicado na Figura 16;
- Após a adição da quinidina, os compostos em estudo ficaram a uma concentração final de 20 μM , o ZOS a 5 μM e a quinidina a 0, 50, 100, 150 e 200 μM ;
- Incubar durante 24 h, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO_2 – 95 % de O_2 ;
- Após a incubação, a citotoxicidade da quinidina foi avaliada pelo ensaio de incorporação do NR da seguinte forma:
 - Aspirar o meio de cultura de todos os poços;
 - Adicionar 150 μL /poço de NR (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em meio de cultura celular);
 - Incubar durante 1 h 30 min, a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5 % de CO_2 – 95 % de O_2 ;
 - No final do período de incubação aspirar todos os poços;
 - Adicionar 150 μL /poço de solução de lise [etanol absoluto/água destilada (1: 1) com 5 % ácido acético] e agitar de forma a garantir a extração e homogeneização do NR;
 - Ler a absorvância a 540 nm no leitor de placas (PowerWaveX BioTek Instruments, Vermont, US). A percentagem de incorporação do NR em relação às células controlo (0 μM) foi usada como medida de citotoxicidade.

3.7. Análise estatística

O GraphPad Prism 6 for Windows (software GraphPad, San Diego, CA, EUA) foi usado para realizar todas as análises estatísticas. Foram realizados 3 testes para avaliar a normalidade da distribuição dos dados: *KS normality test*, *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* and *Shapiro-Wilk normality test*. Para dados com distribuição paramétrica foi utilizado o teste de *One-way ANOVA* para realizar as comparações estatísticas, seguido pelo *Dunnett's multiple comparisons test*. As comparações estatísticas entre os grupos em experiências com duas variáveis (ex. citotoxicidade da daunorrubicina) foram efetuadas usando *Two-way ANOVA*, seguido pelo *Sidak's multiple comparison post hoc test*. Nos ensaios de avaliação da citotoxicidade da daunorrubicina, as curvas concentração-resposta foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados como método de *fitting* e as comparações entre as curvas (LOG IC₅₀, TOP, BOTTOM e Hill Slope) foram efetuadas usando o *extra sum-of-squares F test*. Em cada figura, a respetiva legenda contém a análise estatística realizada. Em todos os casos, valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

IV. RESULTADOS E

DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1. Citotoxicidade dos derivados (Tio)xantônicos

A citotoxicidade dos derivados (tio)xantônicos foi avaliada em células Caco-2, 24 h após exposição, pelo ensaio de incorporação do NR, pelo ensaio de redução do MTT, pelo ensaio de redução da REZ e pelo ensaio de ligação da SRB. A citotoxicidade dos derivados xantônicos foi avaliada para quatro concentrações diferentes (0, 10, 20 e 50 μM). No entanto, nos ensaios com os derivados tioxantônicos a concentração de 50 μM não foi utilizada em resultado da impossibilidade de solubilização dos mesmos. A utilização de 4 metodologias diferentes permite estudar a citotoxicidade dos referidos compostos em função dos diferentes critérios bioquímicos de morte celular de cada metodologia e selecionar, com maior segurança, as concentrações não citotóxicas a utilizar em ensaios subsequentes.

4.1.1. Citotoxicidade dos derivados Xantônicos

Os resultados obtidos do **ensaio de incorporação do NR** estão representados na Figura 17. Tal como é possível verificar, apenas o X4 não causou diferenças significativas na redução do NR, 24 h após exposição a todas as concentrações testadas, e comparativamente com as células controlo (0 μM). Para os compostos X1, X5, X6, X7 verificou-se uma diminuição significativa na redução do NR, apenas para a concentração mais alta testada, 50 μM [95, 86, 88 e 86 %, 24 h após exposição a 50 μM de X1, X5, X6, X7 respetivamente, e em comparação com as células controlo (0 μM , 100 %)]. Verificou-se, igualmente, a ausência de qualquer interferência dos compostos que possam permanecer intracelularmente na absorvância medida a 540 nm (Figura 18). De modo geral, os resultados obtidos no ensaio da incorporação do NR demonstram a falta de citotoxicidade expressiva dos derivados xantônicos nas condições experimentais adotadas.

Resultados e Discussão

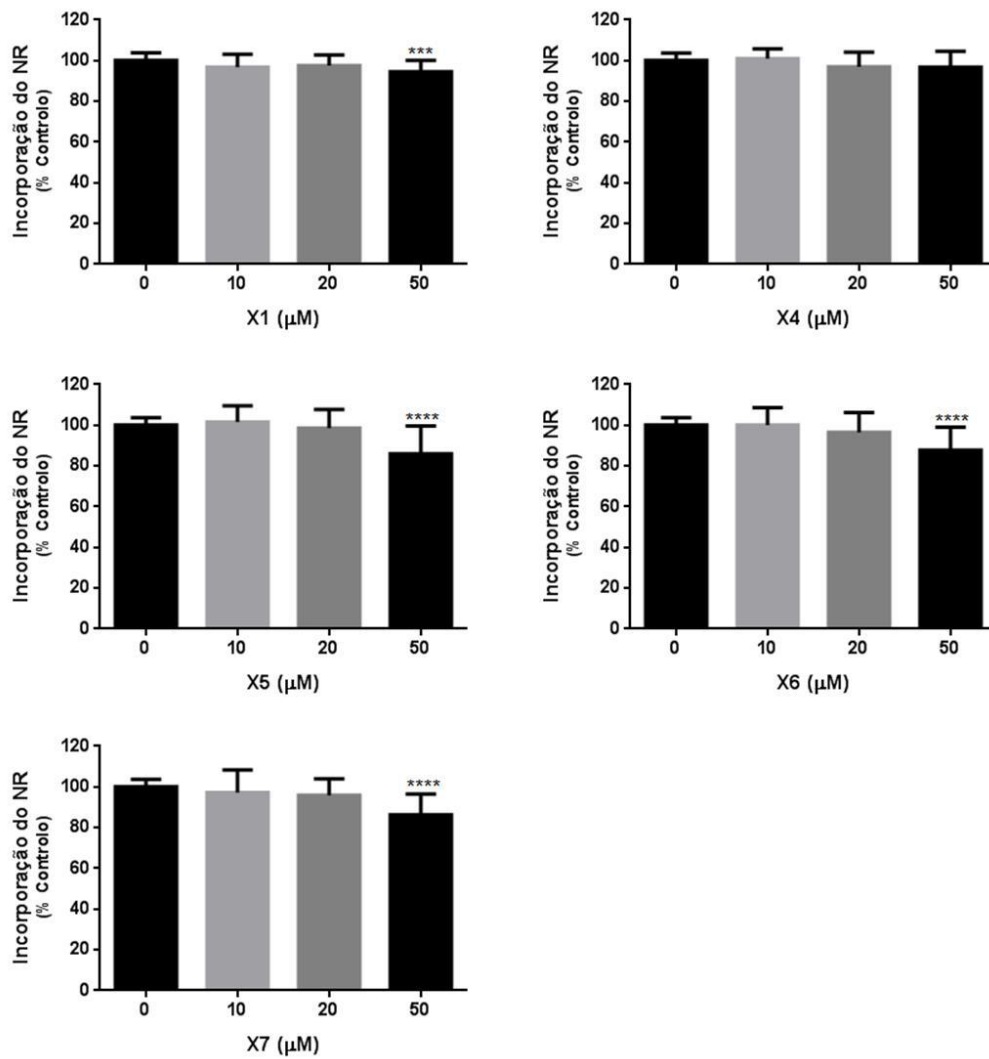


Figura 17. Citotoxicidade dos derivados xantônicos (0 - 50 μM) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro (NR), 24 h após a exposição. Os resultados são apresentados como média \pm SD de pelo menos 6 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnett's multiple comparisons test* [*** p < 0,001; **** p < 0,0001 vs. controle (0 μM)].

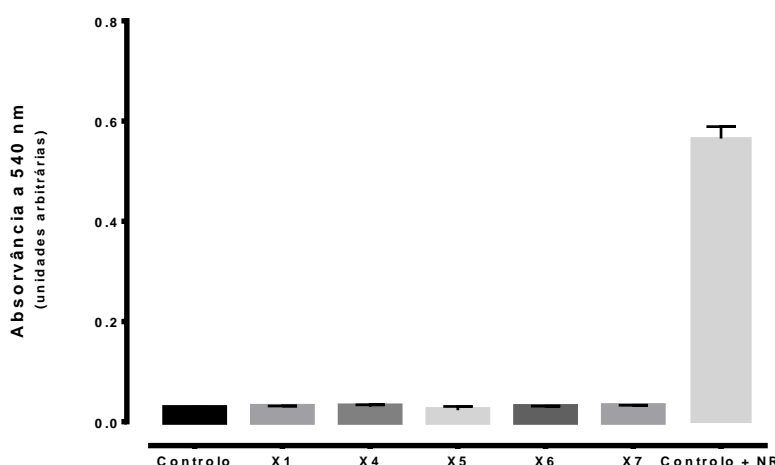


Figura 18. Avaliação da absorbância, a 540 nm, das células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados xantônicos (50 μM). Os resultados são apresentados como média + SD de 1 experiência independente (realizada em triplicado). Controlo + NR – células Caco-2 incubadas com NR tal como descrito no procedimento experimental.

No ensaio de redução do MTT (Figura 19) verificou-se um aumento significativo na redução do MTT 24 h após exposição ao derivado X1, para todas as concentrações testadas. Por outro lado, para o X5 e X7, verificou-se um aumento significativo na redução do MTT 24 h após exposição às concentrações de 10 e 20 μM , tendo ocorrido o oposto para a concentração 50 μM , ou seja uma diminuição significativa na redução do MTT [83 e 87 % 24 h após exposição a 50 μM de X5 e X7, respetivamente, quando comparado com as células controlo (0 μM , 100 %)]. Para o composto X6, e apenas para a concentração 50 μM , verificou-se uma diminuição significativa na redução do MTT, em comparação com as células controlo (a % de redução do MTT diminuiu para 82 %). Por último, para o composto X4, verificou-se um aumento significativo na redução do MTT para as concentrações de 10 e 20 μM (106 e 112 %, respetivamente), enquanto que para a concentração 50 μM não se verificou diferença significativa em comparação com as células controlo (0 μM).

Resultados e Discussão

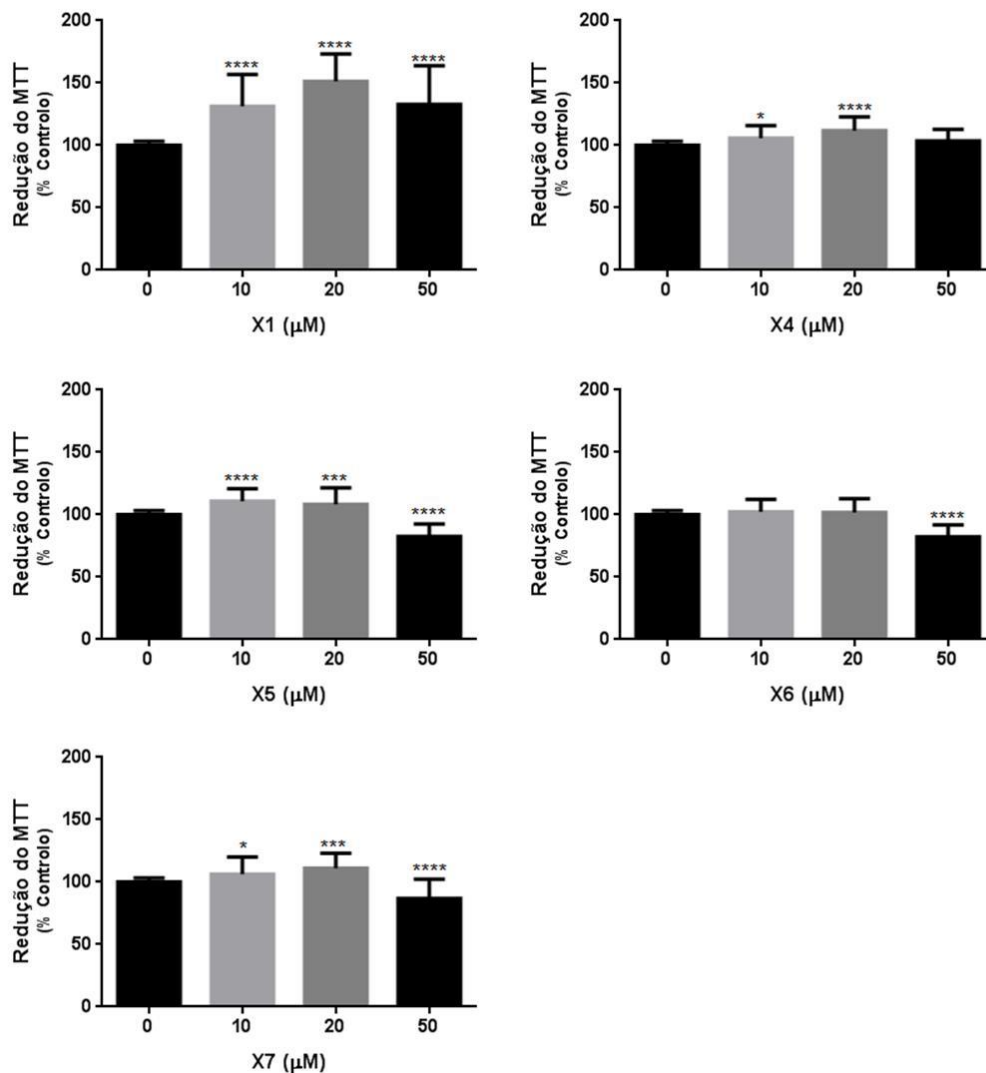


Figura 19. Citotoxicidade dos derivados xantônicos (0 - 50 μM) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de redução do MTT, 24 h após a exposição. Os resultados são apresentados como média \pm SD de pelo menos 7 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnnett's multiple comparisons test* [* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. controle (0 μM)].

Salienta-se que as células Caco-2 crescem em monocamada e apenas foram expostas aos compostos em estudo após atingirem a confluência (3 dias após sementeira), momento a partir do qual se diferenciam espontaneamente [uma vez que ocorre inibição da proliferação por contato celular (Rashid and Basson, 1996)]. Assim, o aumento observado na redução do MTT não poderá ter ocorrido por aumento na proliferação celular após exposição a estes derivados xantônicos, nomeadamente ao derivado X1. Deste modo, podem sugerir-se duas explicações possíveis para os resultados obtidos: 1) os compostos absorvem no

mesmo comprimento de onda que os cristais de formazano formados (550 nm); 2) o MTT é reduzido não enzimaticamente pelo composto em estudo (e/ou potenciais metabolitos) e não apenas reduzido pelas oxidoreduases e desidrogenases das células metabolicamente ativas.

Para elucidar a possível contribuição da absorvância dos derivados xantônicos nos resultados obtidos, as células Caco-2 foram expostas, durante 24 h, à concentração mais elevada de todos os compostos em estudo (50 μ M). No final dessa incubação, o meio de cultura foi removido e as células incubadas com meio de cultura sem MTT durante 1 h, simulando o procedimento experimental realizado no ensaio de redução do MTT. Após incubação, o meio de cultura foi removido, seguindo-se a adição de DMSO e a leitura da absorvância a 550 nm. Com este ensaio pretendeu-se verificar se a “auto-absorvância” de células incubadas com os compostos poderia contribuir para o aumento observado na redução do MTT. Tal como ilustrado na Figura 20, não se observaram diferenças significativas na absorvância de células Caco-2 expostas aos derivados xantônicos durante 24 h, comparativamente com as células controlo (0 μ M). De salientar que os aumentos na redução do MTT foram particularmente marcados para o X1, pelo que o seu potencial redutor, e/ou dos seu(s) metabolito(s), poderá justificar os efeitos observados.

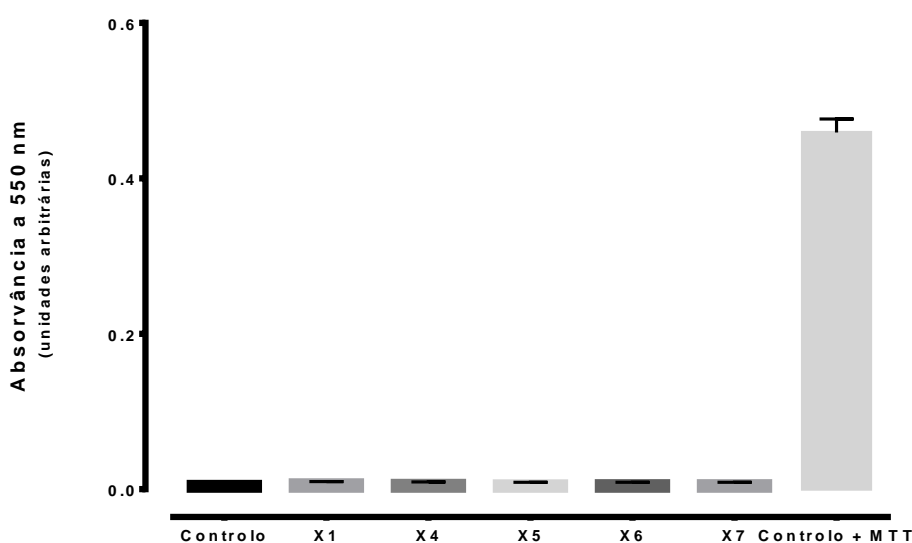


Figura 20. Avaliação da absorvância, a 550 nm, das células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados xantônicos (50 μ M). Os resultados são apresentados como média + SD de 1 experiência independente (realizada em triplicado). Controlo + MTT – células Caco-2 incubadas com MTT tal como descrito no procedimento experimental.

No ensaio de redução da REZ (Figura 21) não se verificaram diferenças significativas 24 h após exposição das células Caco-2 aos compostos X1, X5, X6, para nenhuma das concentrações testadas. Para o composto X4 verificou-se um ligeiro, mas significativo, aumento na redução da REZ 24 h após exposição às concentrações de 20 e 50 μM , em comparação com as células controlo (a % de redução da REZ aumentou para 105 %, 24 h após exposição a ambas as concentrações). Por último, para o composto X7, houve uma diminuição significativa da redução da REZ para a concentração mais alta testada (50 μM), em comparação com as células controlo (0 μM).

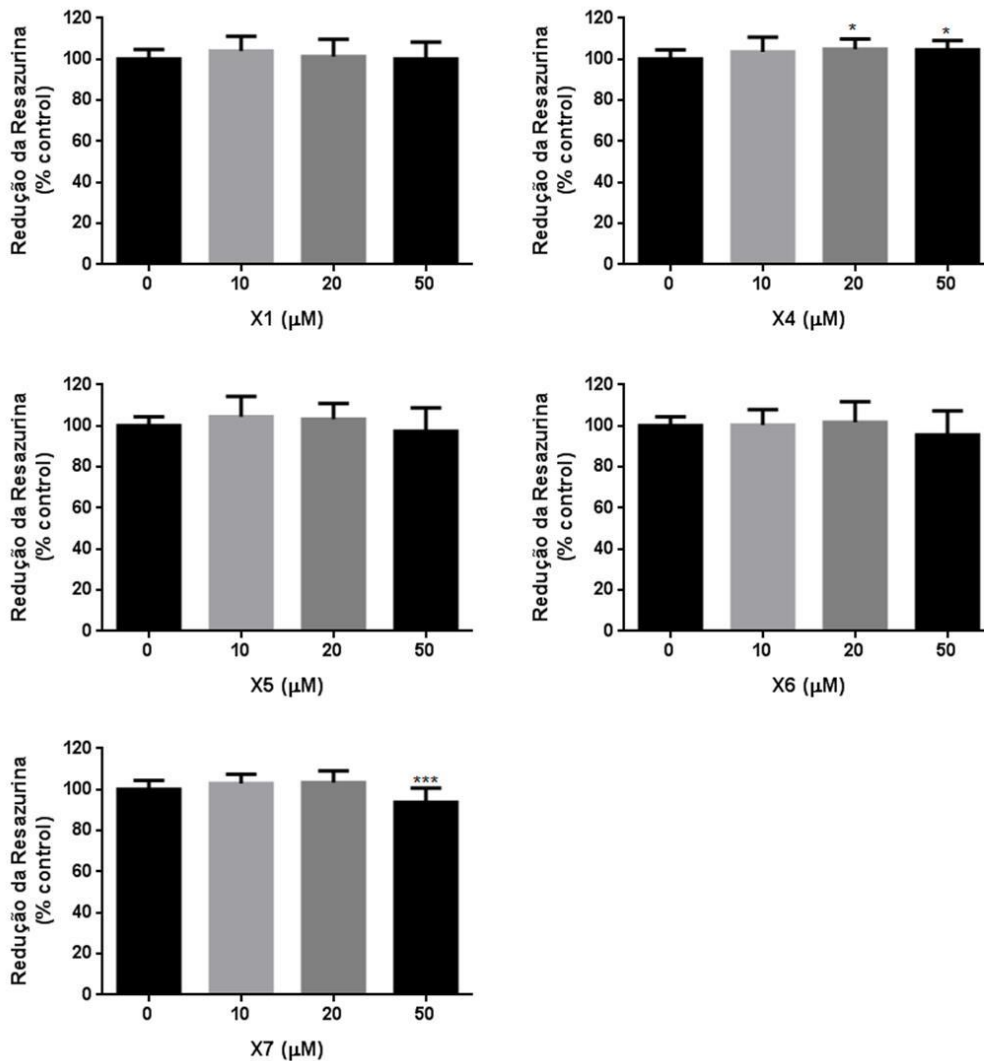


Figura 21. Citotoxicidade dos derivados xantónicos (0 - 50 μM) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de redução da Resazurina, 24 h após a exposição. Os resultados são apresentados como média \pm SD de pelo menos 5 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnnett's multiple comparisons test* [$*p < 0,05$; $***p < 0,001$ vs. controlo (0 μM)].

Apesar dos aumentos observados na redução da REZ serem menos acentuados comparativamente com os aumentos observados no ensaio de redução do MTT, foi igualmente avaliada a “auto-fluorescência” de células Caco-2 expostas aos derivados xantônicos durante 24 h. Tal como pode ser observado na Figura 22, não se verificaram diferenças significativas na fluorescência de células expostas ou não aos derivados xantônicos e, por este motivo, a fluorescência do composto (ou metabolitos) que permanecem intracelularmente não parece contribuir para os ligeiros aumentos observados no ensaio de redução da REZ.

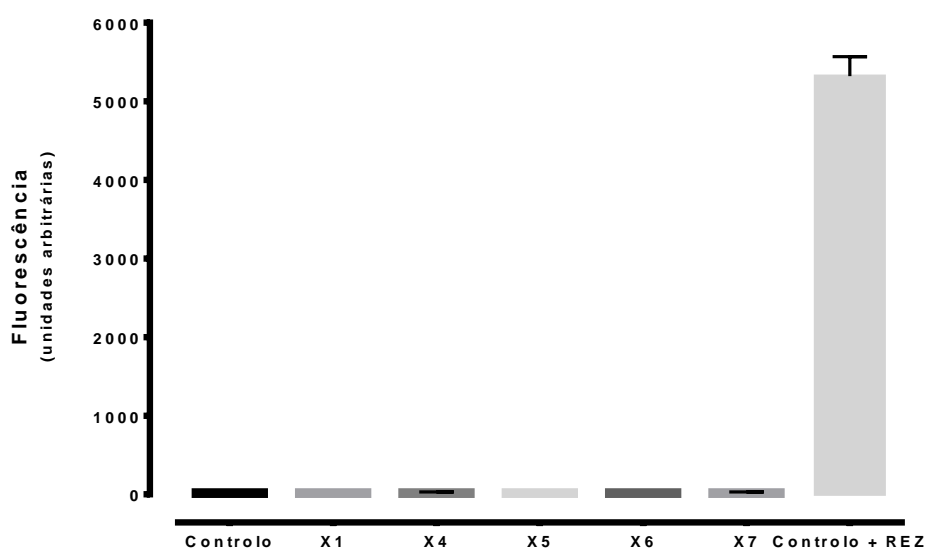


Figura 22. Avaliação da fluorescência das células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados xantônicos (50 μ M) (comprimentos de onda de excitação/emissão de 560/590 nm, respetivamente). Os resultados são apresentados como média + SD de 1 experiência independente (realizada em triplicado). Controlo + REZ – células Caco-2 incubadas com REZ tal como descrito no procedimento experimental.

Por último, na Figura 23 estão representados os resultados obtidos no **ensaio de ligação da SRB**, realizado 24 h após exposição aos derivados xantônicos. Verificou-se que não existiram diferenças significativas na ligação da SRB às proteínas celulares 24 h após exposição ao composto X4, em nenhuma das concentrações testadas, e em comparação com as células controlo (0 μ M). Por outro lado, para os compostos X1, X5, X6 e X7 houve uma diminuição significativa na ligação da SRB para a mais elevada concentração testada, 50 μ M,

em comparação com as células controlo [88, 92, 92 e 89 % após exposição a 50 μ M de X1, X5, X6 e X7, respetivamente, e em comparação com as células controlo (0 μ M, 100 %)], demonstrando uma redução ligeira mas significativa do número de células em cultura.

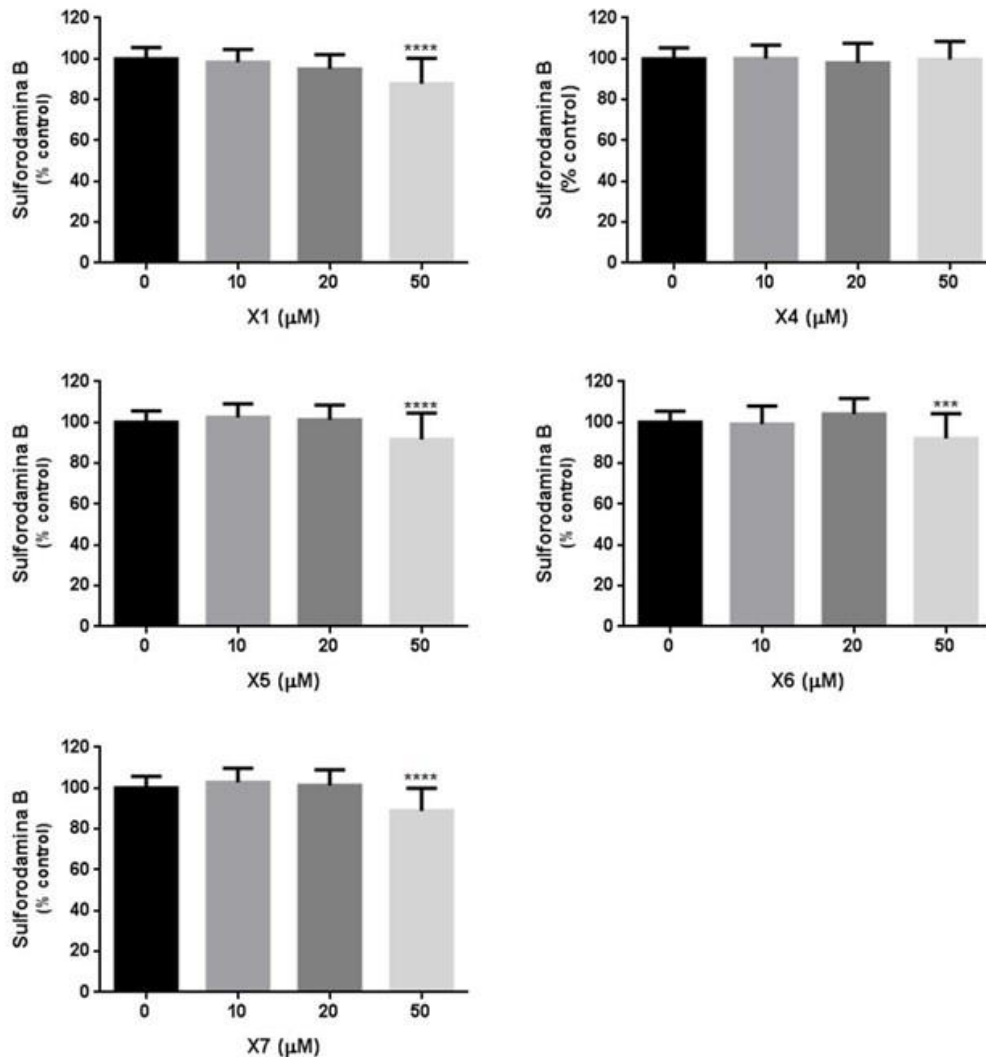


Figura 23. Citotoxicidade dos derivados xantônicos (0 - 50 μ M) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio da Sulforodamina B, 24 h após a exposição. Os resultados são apresentados como média \pm SD de pelo menos 6 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnett's multiple comparisons test* [*** p <0,001; **** p <0,0001 vs. controlo (0 μ M)].

Os resultados apresentados descrevem a citotoxicidade dos derivados xantônicos por 4 metodologias diferentes e permitem selecionar a concentração de 20 μ M como a concentração a usar nos estudos de avaliação do efeito dos compostos nas expressão e atividade da P-gp. A seleção desta concentração

decorre de duas razões: 1) a concentração de 50 μM causou uma ligeira mas significativa citotoxicidade para alguns dos derivados xantónicos testados; 2) estudos *in vitro* demonstraram que alguns derivados xantónicos semelhantes aos estudados tinham a capacidade de induzir e/ou ativar a P-gp quando testados a 20 μM nas células Caco-2 (Martins et al., 2019; Silva et al., 2014b).

4.1.2. Citotoxicidade dos derivados Tioxantónicos

Os resultados obtidos no **ensaio de incorporação do NR** estão representados na Figura 24. De acordo com os resultados obtidos, para os compostos Tx1, Tx4, Tx5, Tx7, Tx9, Tx10, não se observaram diferenças significativas na incorporação do NR, para as concentrações de 10 μM e 20 μM , comparativamente com as células controlo (0 μM). Deste modo, e para nenhuma das concentrações testadas, ocorreram efeitos citotóxicos significativos 24 h após exposição. Por outro lado, para os compostos Tx2, Tx3 e Tx6, verificou-se uma reduzida, mas significativa, diminuição na incorporação do NR para a concentração mais alta testada (20 μM), comparativamente às células controlo (0 μM). De facto, a incorporação do NR reduziu para 94, 93 e 94 %, 24 h após exposição das células Caco-2 a Tx2, Tx3 e Tx6 (20 μM), respetivamente. Para o composto Tx8, e 24 h após exposição, não se verificou nenhuma redução significativa da incorporação do NR para a concentração mais alta testada (20 μM), enquanto que a exposição à concentração de 10 μM resultou numa redução ligeira, mas significativa, da incorporação do NR [redução da incorporação do NR para 95 %, quando comparado com as células controlo (0 μM , 100 %)]. À semelhança dos resultados obtidos para os derivados xantónicos, não se verificou qualquer interferência da absorvância dos derivados tioxantónicos que possam permanecer no interior das células na absorvância medida a 540 nm (Figura 25).

Resultados e Discussão

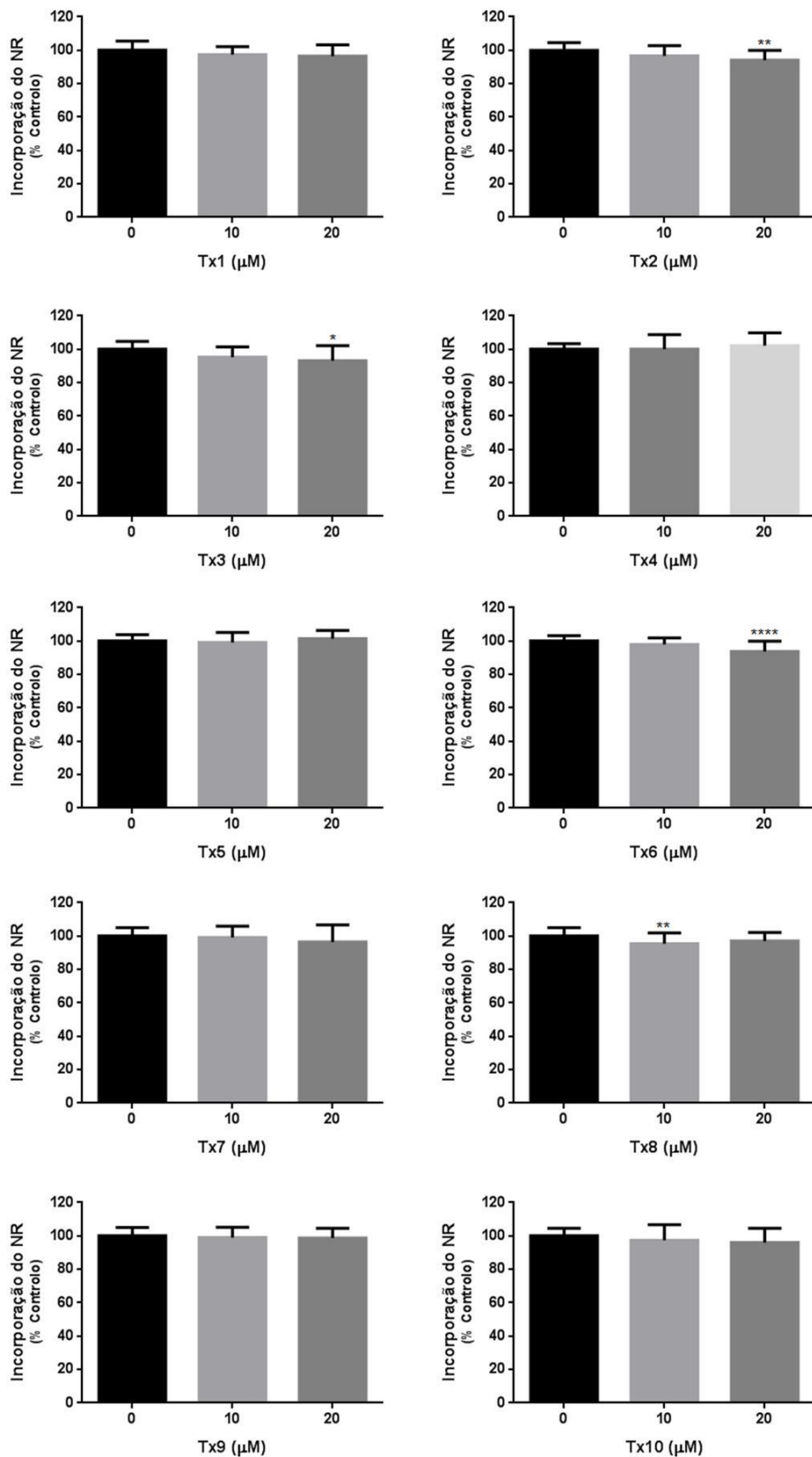


Figura 24. Citotoxicidade dos derivados tiofantônicos (0 - 20 µM) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro (NR), 24 h após a exposição. Os resultados são apresentados como média ± SD de pelo menos 5 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnnett's multiple comparisons test* [$*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $****p < 0,0001$ vs. controle (0 µM)].

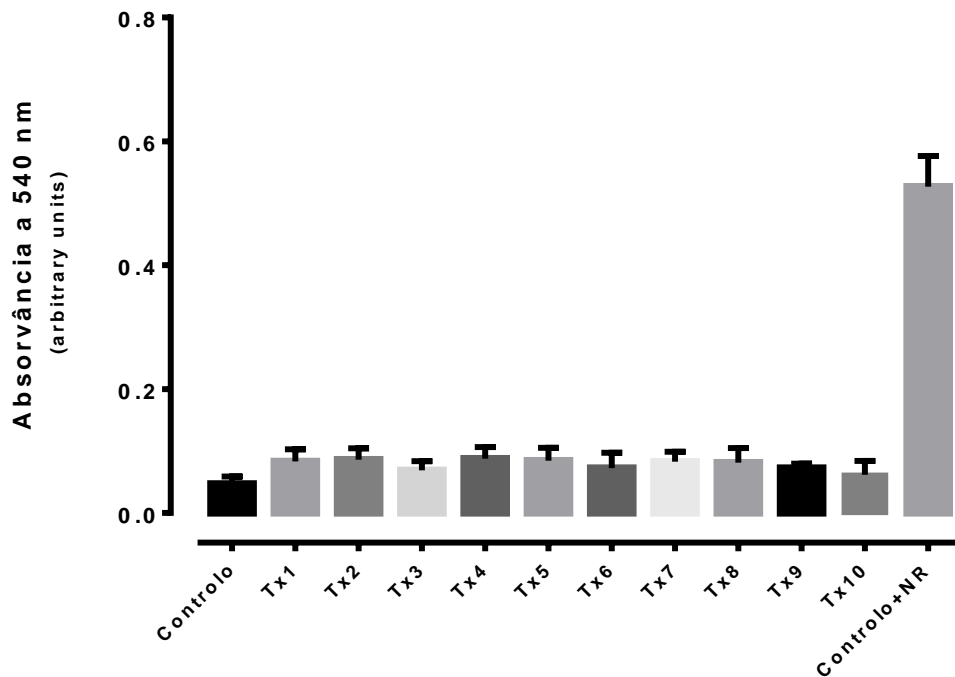


Figura 25. Avaliação da absorvância, a 540 nm, das células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados tioxantônicos (20 μM). Os resultados são apresentados como média + SD de 1 experiência independente (realizada em triplicado). Controlo + NR – células Caco-2 incubadas com NR tal como descrito no procedimento experimental.

Os resultados obtidos no **ensaio de redução do MTT** (Figura 26) demonstram a ausência de diferenças significativas na redução do MTT para o composto Tx7 em ambas as concentrações testadas (10 e 20 μM) e 24 h após exposição, comparativamente com as células controlo (0 μM). No entanto, para os compostos Tx1, Tx2, Tx3, Tx4, Tx6, Tx8, Tx9, Tx10, e para ambas as concentrações testadas, verificou-se um aumento significativo da redução do MTT. Por outro lado, para o Tx5, este aumento significativo da redução do MTT foi apenas verificado para a concentração de 20 μM , não tendo sido observado qualquer efeito significativo na redução do MTT 24 h após exposição à concentração de 10 μM .

Resultados e Discussão

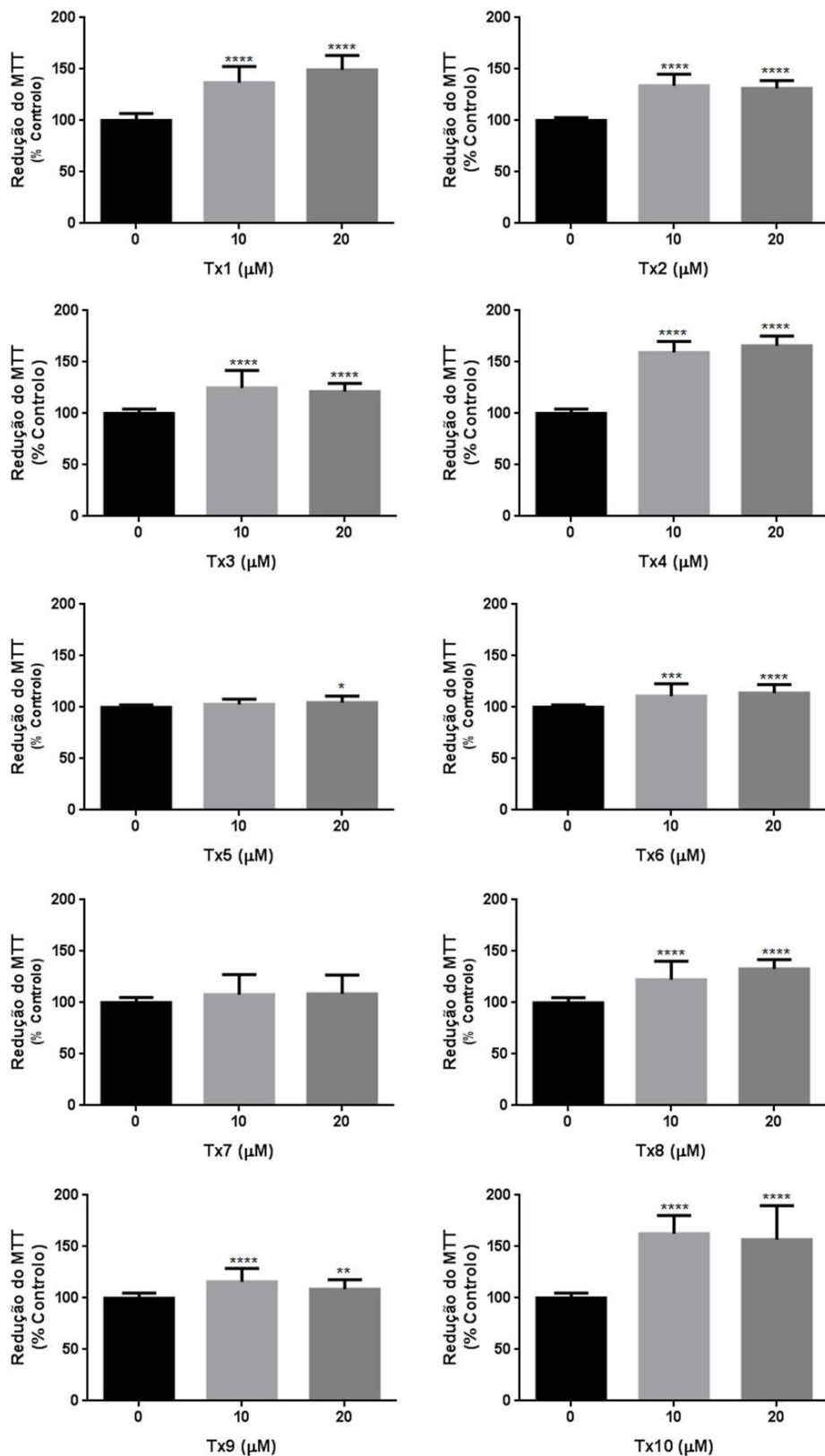


Figura 26. Citotoxicidade dos derivados tioantônicos (0 - 20 μM) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de redução do MTT, 24 h após a exposição. Os resultados são apresentados como média \pm SD de pelo menos 4 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnett's multiple comparisons test* [$*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$ vs. controle (0 μM)].

À semelhança do efetuado para os derivados xantônicos, foi igualmente avaliado o potencial contributo da absorvância dos derivados tioxantônicos (e/ou metabolitos) no aumento observado na redução da MTT. Do mesmo modo, tal como é possível observar na Figura 27, não existem diferenças significativas na absorvância de células expostas aos derivados tioxantônicos, comparativamente com as células controlo, não justificando, assim, os aumentos observados no ensaio de redução do MTT.

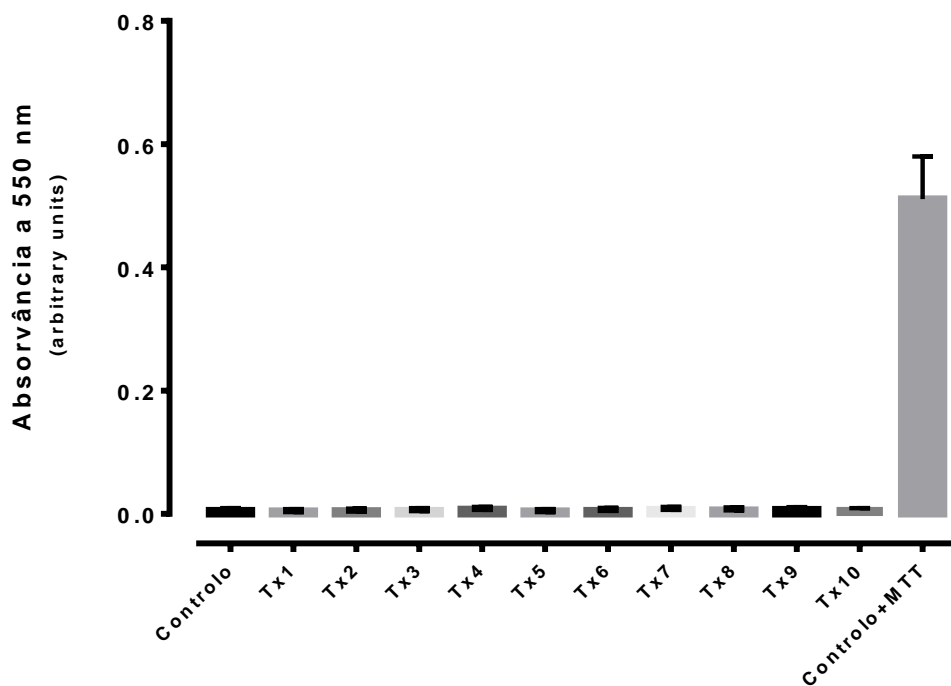


Figura 27. Avaliação da absorvância, a 550 nm, das células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados tioxantônicos (20 μM). Os resultados são apresentados como média + SD de 1 experiência independente (realizada em triplicado). Controlo + MTT – células Caco-2 incubadas com MTT tal como descrito no procedimento experimental.

No ensaio de redução da REZ (Figura 28) verificou-se um aumento significativo na redução da REZ, 24 h após exposição a todos os derivados tioxantônicos (Tx1, Tx2, Tx3, Tx4, Tx5, Tx6, Tx7, Tx8, Tx9, Tx10) e para ambas as concentrações testadas (10 e 20 μM), comparativamente com as células controlo (0 μM).

Resultados e Discussão

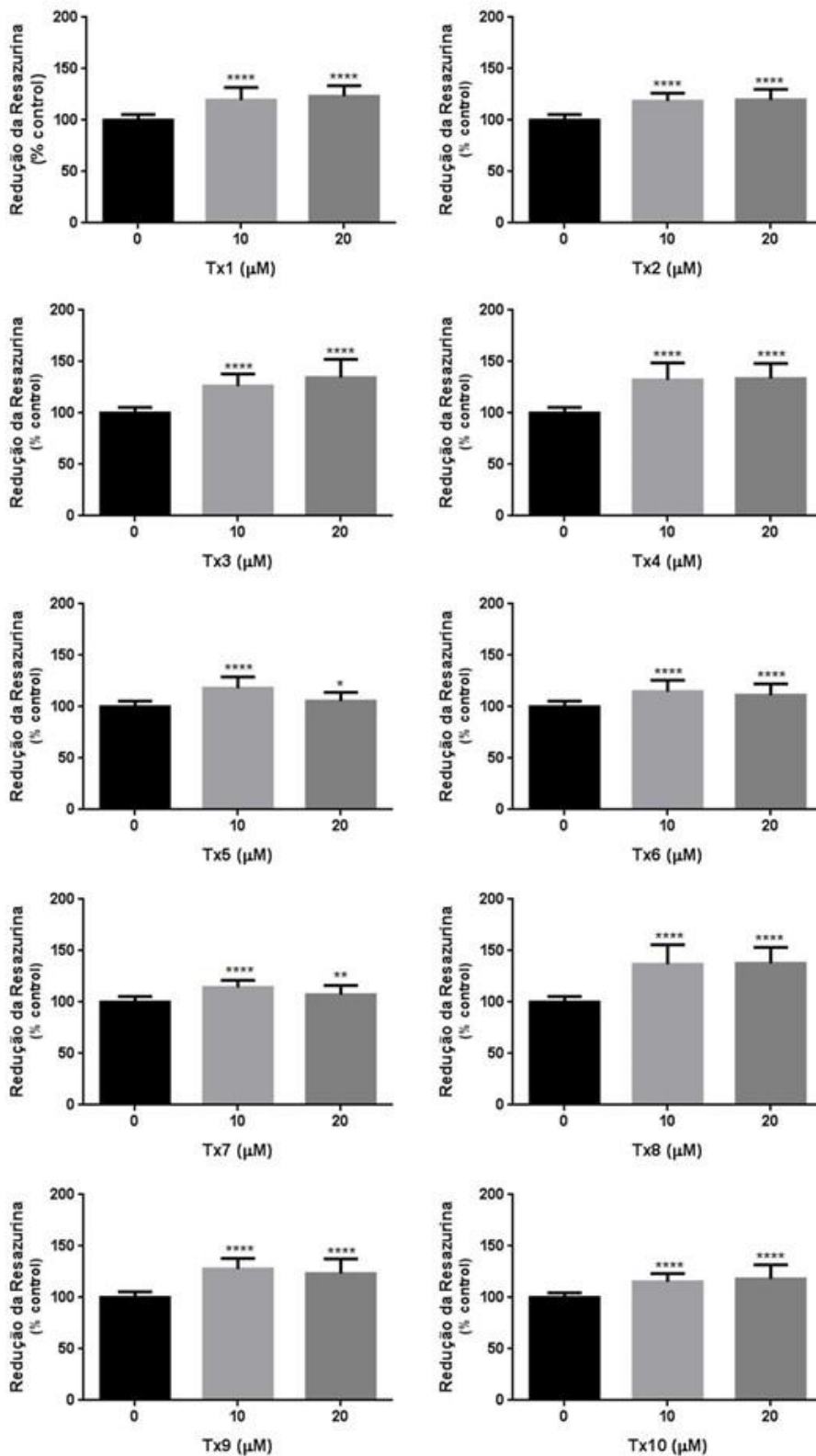


Figura 28. Citotoxicidade dos derivados tioantônicos (0 - 20 μM) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de redução da Resazurina, 24 h após a exposição. Os resultados são apresentados como média \pm SD de pelo menos 6 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnnett's multiple comparisons test* [$*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $****p < 0,0001$ vs. controle (0 μM)].

À semelhança do efetuado no ensaio de redução do MTT, foi avaliada a autofluorescência das células Caco-2, 24 h após incubação com os derivados tioxantônicos (20 μM), com o objetivo de avaliar o potencial contributo da fluorescência dos compostos que permanecem intracelularmente nos resultados obtidos. Tal como pode ser observado na Figura 29, não se verificaram diferenças significativas na fluorescência das células Caco-2 comparativamente com as células controlo (0 μM), não constituindo assim uma justificação para os aumentos observados na redução da REZ. Deste modo, e tal como no ensaio do MTT, o potencial redutor dos compostos poderá justificar os resultados obtidos, causando a redução não enzimática da REZ e contribuindo para os aumentos observados na fluorescência.

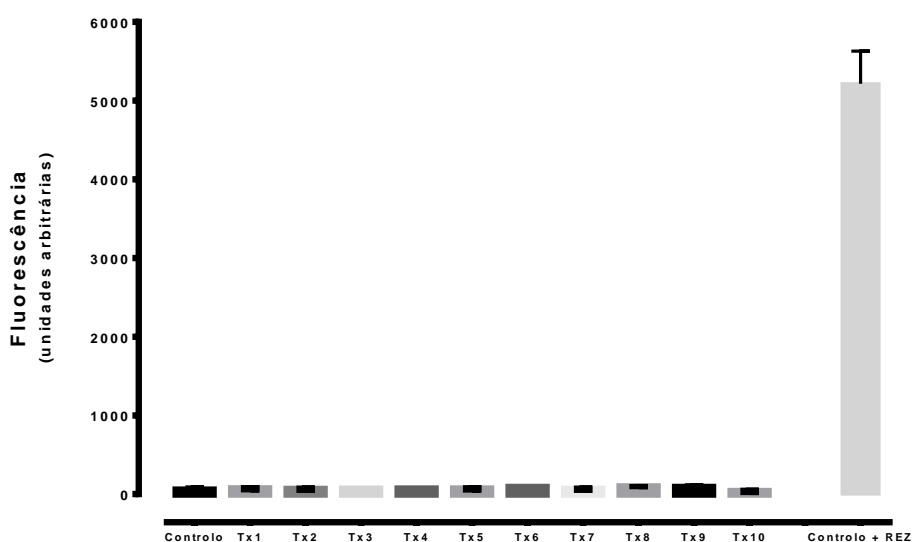


Figura 29. Avaliação da fluorescência das células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados tioxantônicos (20 μM) (comprimentos de onda de excitação/emissão de 560/590 nm, respetivamente). Os resultados são apresentados como média + SD de 1 experiência independente (realizada em triplicado). Controlo + REZ – células Caco-2 incubadas com REZ tal como descrito no procedimento experimental.

Por último, no **ensaio de ligação da SRB** (Figura 30) não se verificaram quaisquer diferenças significativas na ligação do corante às proteínas celulares, para ambas as concentrações testadas (10 e 20 μM), 24 h após exposição aos compostos Tx1, Tx2, Tx3, Tx7, Tx8, Tx9 e Tx10, e comparativamente com as células controlo (0 μM). Por outro lado, para os compostos Tx4, Tx5 e Tx6, verificou-se um ligeiro, mas significativo aumento na ligação da SRB para a

concentração 20 μM [104, e 105 e 106 % após exposição a Tx4, Tx5 e Tx6, respetivamente, em comparação com as células controlo (0 μM , 100 %)].

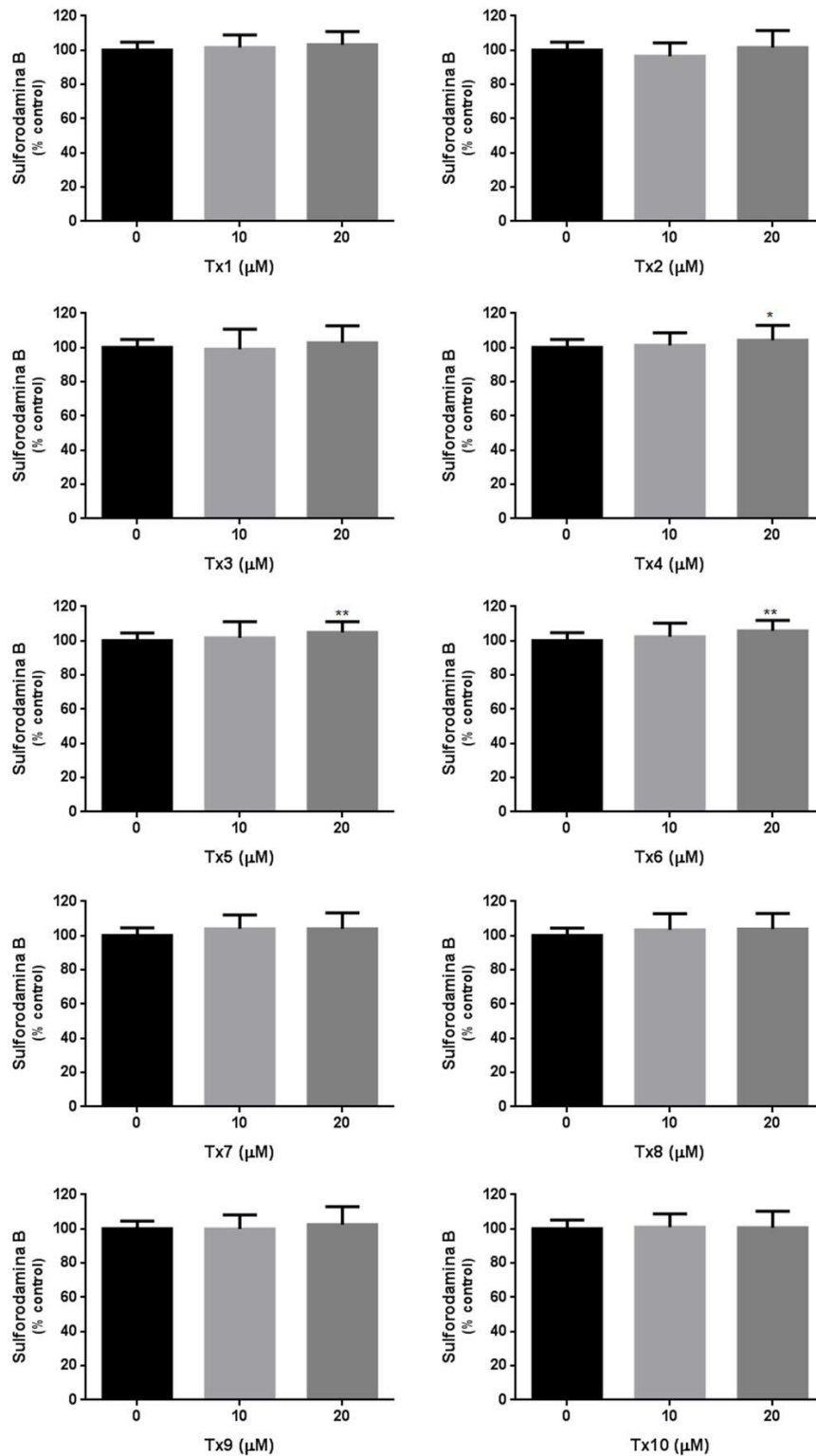


Figura 30. Citotoxicidade dos derivados tioantônicos (0 - 20 μM) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio da Sulforodamina B, 24 h após a exposição. Os resultados são apresentados como média \pm SD de pelo menos 6 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnett's multiple comparisons test* [$*p < 0,05$; $**p < 0,01$ vs. controlo (0 μM)].

De acordo com os resultados obtidos, os ensaios de redução do MTT e de redução da REZ realçam potenciais interferências dos compostos em estudo com as duas metodologias adotadas, provavelmente devidas ao potencial redutor dos compostos, o qual deverá ser cuidadosamente avaliado. Destaca-se, igualmente, a necessidade da execução de diferentes ensaios de citotoxicidade, baseados em diferentes princípios metodológicos (e. g. atividade metabólica e integridade da membrana), na avaliação do perfil toxicológico de novos compostos.

Por último, com base nos resultados obtidos nos ensaios de incorporação do NR e de ligação da SRB, foi selecionada a concentração de 20 μ M como a concentração a utilizar na avaliação do efeito dos compostos na expressão e atividade da P-gp, dada a ausência de citotoxicidade relevante. Esta concentração foi igualmente selecionada tendo por base resultados descritos na literatura em que se demonstrou a capacidade indutora e/ou ativadora da P-gp de derivados tioxantônicos semelhantes, na mesma concentração e no mesmo modelo *in vitro*, as células Caco-2 (Lopes et al., 2018; Silva et al., 2015a).

4.2. Efeito dos derivados (Tio)xantônicos na expressão e atividade da P-gp

4.2.1. Estudo da autofluorescência dos derivados (tio)xantônicos

A avaliação do efeito dos derivados (tio)xantônicos na atividade da P-gp foi precedida de um estudo da autofluorescência, por citometria de fluxo e espectrofotometria, de células Caco-2 pré-incubadas com os referidos compostos. Este estudo teve por objetivo verificar se a possível autofluorescência dos derivados (tio)xantônicos poderá interferir com a fluorescência da RHO 123 (substrato da P-gp a usar nos ensaios de avaliação da atividade deste transportador).

No ensaio em que se avaliou, por citometria de fluxo, a autofluorescência de células pré-incubadas com os derivados xantônicos X1, X4, X5, X6, X7, a 20 μ M, verificou-se que não existia interferência na fluorescência da RHO 123 para nenhum dos compostos em estudo (Figura 31). De fato, apesar das células pré-incubadas com X5 apresentarem um ligeiro aumento da intensidade média de fluorescência (deslocamento do histograma para a direita), esse aumento não tem qualquer interferência na fluorescência das células quando estas são incubadas com RHO 123, na presença ou ausência de ZOS (inibidor da P-gp usado nos referidos ensaios). A autofluorescência das células Caco-2 com ou sem incubação com os derivados xantônicos foi igualmente avaliada por espectrometria de fluorescência, de modo a mimetizar os ensaios de atividade a realizar posteriormente. Assim, e tal como ensaio anterior, não se verificou qualquer interferência dos derivados xantônicos na fluorescência da RHO 123 (Figura 32).

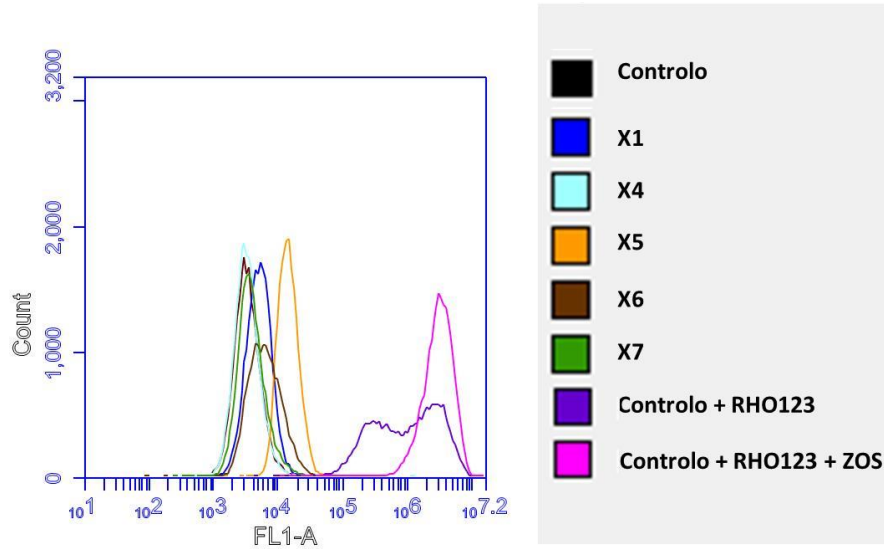


Figura 31. Histogramas representativos da análise, por citometria de fluxo, da autofluorescência de células Caco-2 no filtro de 530 ± 15 nm (detetor FL1), 24 h após incubação com os derivados xantônicos ($20 \mu\text{M}$). A roxo e a rosa encontram-se igualmente representadas a fluorescência de células controlo ($0 \mu\text{M}$) após o protocolo de incubação com RHO 123 na ausência ou presença de ZOS, respetivamente.

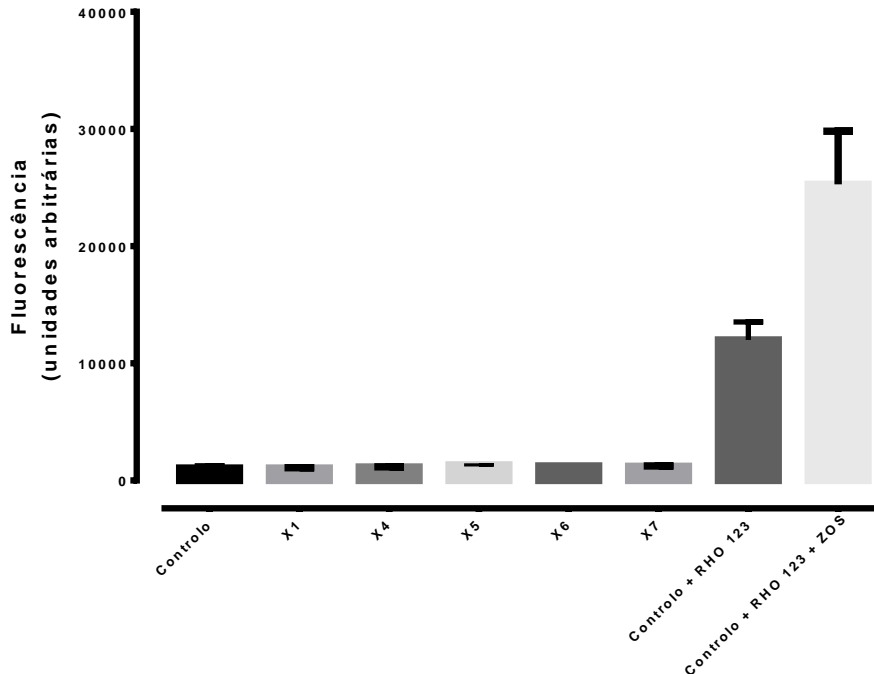


Figura 32. Avaliação da fluorescência das células Caco-2 expostas aos derivados xantônicos ($20 \mu\text{M}$) durante 24 h, avaliada por espectrometria de fluorescência. Os resultados são apresentados como média + SD de 1 experiência independente (realizada em triplicado). Controlo + RHO 123 – células Caco-2 incubadas com RHO 123; Controlo + RHO 123 + ZOS - células Caco-2 incubadas com RHO 123 e ZOS, tal como descrito no ensaio de avaliação dos efeitos imediato na atividade da P-gp.

Procedeu-se igualmente à avaliação, por citometria de fluxo, da capacidade dos compostos xantônicos X1, X4, X5, X6, X7 para interferir com a fluorescência do anticorpo UIC2-PE usado para a avaliação da expressão da P-gp. Para esse efeito, as células Caco-2 foram pré-expostas (24 h) aos derivados xantônicos (20 μ M), e posteriormente tratadas de forma idêntica ao ensaio de avaliação da expressão da P-gp. Demonstrou-se, como se pode verificar na Figura 33, a ausência de interferência da autofluorescência das células Caco-2 pré-incubadas na ausência ou presença dos compostos em estudo, na fluorescência do anticorpo UIC2-PE.

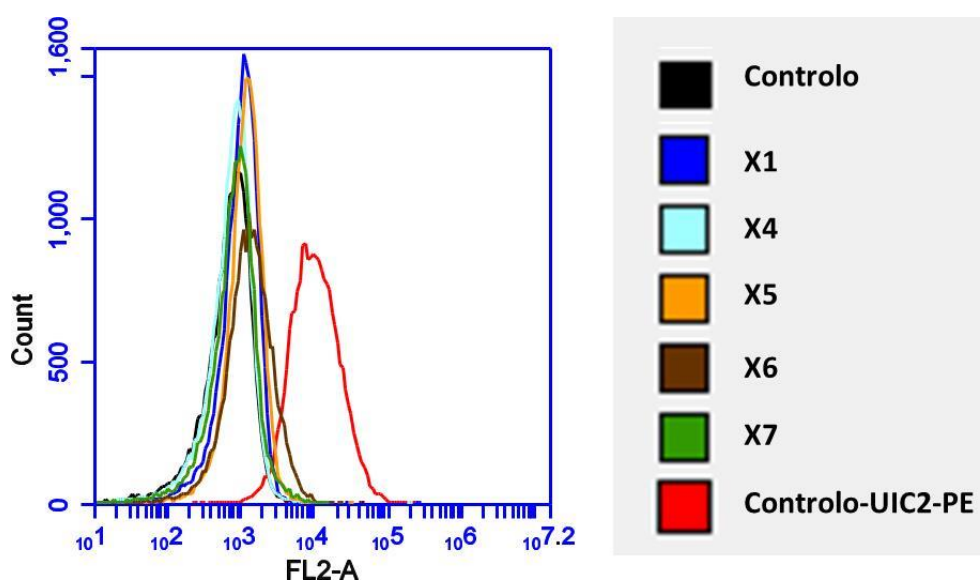


Figura 33. Histogramas representativos da análise, por citometria de fluxo, da autofluorescência de células Caco-2 no filtro de 585 ± 40 nm (detetor FL2), 24 h após incubação com os derivados xantônicos (20,0 μ M). A preto e a vermelho encontram-se igualmente representadas a autofluorescência de células controlo (0 μ M) e a fluorescência de células controlo incubadas com UIC2-PE, respetivamente.

Avaliou-se, igualmente, por citometria de fluxo e espetrometria de fluorescência, a autofluorescência das células Caco-2 expostas aos derivados tioxantônicos Tx1, Tx2, Tx3, Tx4, Tx5, Tx6, Tx7, Tx8, Tx9 e Tx10 (20 μ M), com o objetivo de verificar potenciais interferências na fluorescência da RHO 123. No ensaio em que se avaliou, por citometria de fluxo, a autofluorescência de células Caco-2 expostas aos derivados tioxantônicos, verificou-se a ausência de interferência na fluorescência da RHO 123 para os compostos Tx1, Tx5, Tx7, Tx8,

Tx9 e Tx10. Pelo contrário, a exposição das células aos compostos Tx2, Tx3, Tx4 e Tx6 resultou num aumento acentuado na fluorescência intracelular, inviabilizando a avaliação do seu efeito na atividade da P-gp (Figura 34). A avaliação da autofluorescência de células expostas aos derivados tioxantônicos foi igualmente realizada por espectrometria de fluorescência, de modo a mimetizar os ensaios de atividade que foram realizados posteriormente, onde se confirmou a ausência de interferência dos derivados tioxantônicos Tx1, Tx5, Tx7, Tx8, Tx9 e Tx10 na fluorescência da RHO 123 (Figura 35).

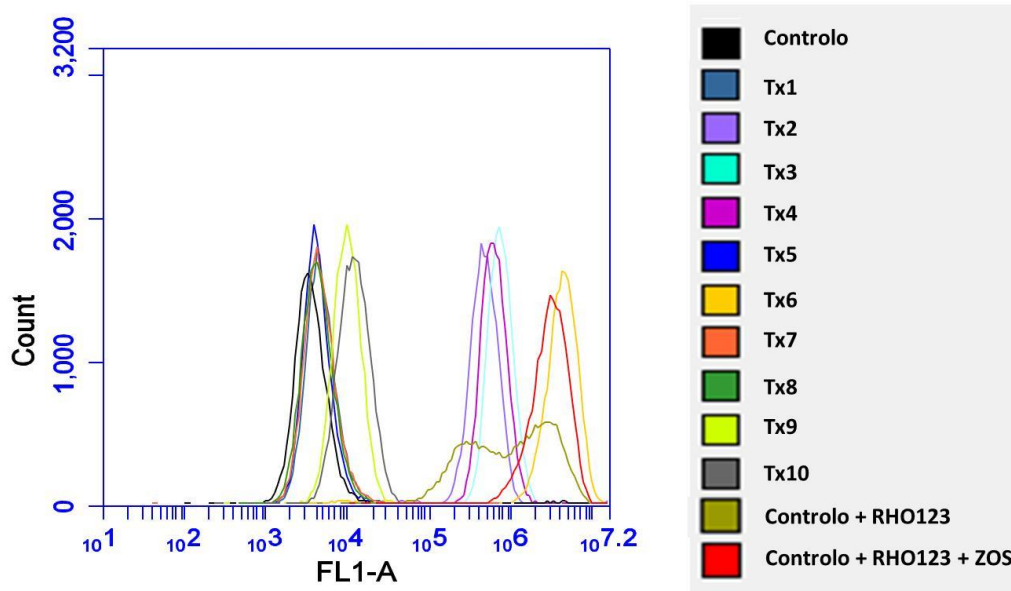


Figura 34. Histogramas representativos da análise, por citometria de fluxo, da autofluorescência de células Caco-2 no filtro de 530 ± 15 nm (detetor FL1), 24 h após incubação com os derivados tioxantônicos ($20 \mu\text{M}$). Encontram-se igualmente representadas a fluorescência de células controlo ($0 \mu\text{M}$) após o protocolo de incubação com RHO 123 na ausência (■) ou presença de ZOS (■).

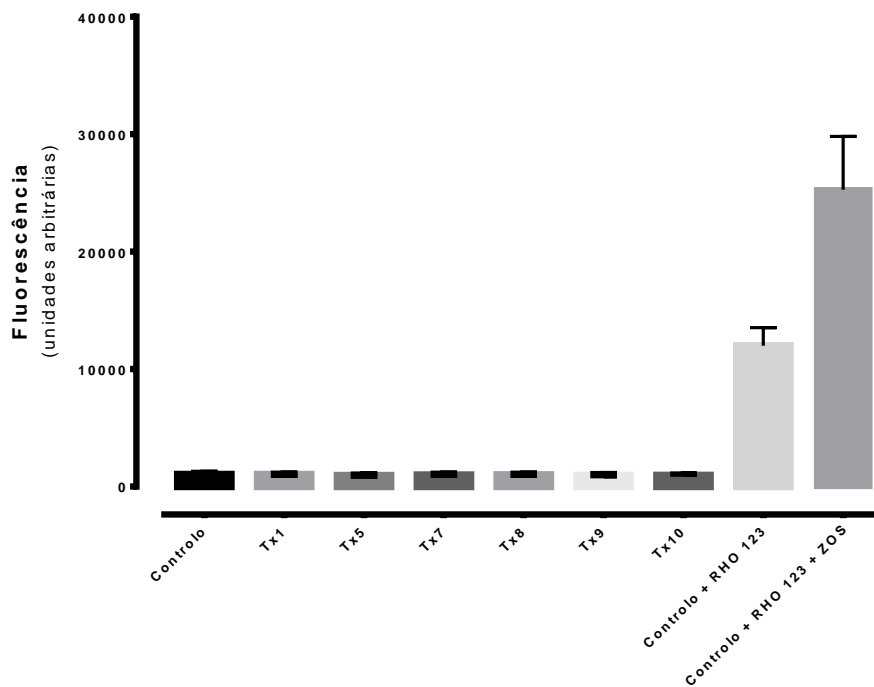


Figura 35. Avaliação da fluorescência das células Caco-2 expostas aos derivados tioxantônicos (20 μ M) durante 24 h, avaliada por espectrometria de fluorescência. Os resultados são apresentados como média + SD de 1 experiência independente (realizada em triplicado). Controle + RHO 123 – células Caco-2 incubadas com RHO 123; Controle + RHO 123 + ZOS - células Caco-2 incubadas com RHO 123 e ZOS, tal como descrito no ensaio de avaliação dos efeitos imediato na atividade da P-gp.

Posteriormente, foi avaliada, por citometria de fluxo, a capacidade dos compostos Tx1, Tx2, Tx3, Tx4, Tx5, Tx6, Tx7, Tx8, Tx9 e Tx10 para interferir com a fluorescência do anticorpo UIC2-PE usado para avaliação da expressão da P-gp. Para esse efeito, as células Caco-2 foram incubadas durante 24 h, na presença ou ausência dos derivados tioxantônicos (20 μ M), e posteriormente analisadas de forma idêntica ao ensaio de expressão. Demonstrou-se, como se pode verificar na Figura 36, a ausência de interferência da fluorescência dos compostos Tx1, Tx5, Tx7 e Tx8 na fluorescência do anticorpo. Por outro lado, verificou-se um aumento acentuado na fluorescência intracelular de células expostas a Tx2, Tx3, Tx4, Tx6, Tx9, Tx10, impossibilitando a avaliação do efeito destes derivados tioxantônicos na expressão da P-gp. De fato, para alguns dos compostos testados (ex: Tx2, Tx3 e Tx6), a fluorescência medida foi bastante superior à fluorescência de células controle incubadas com o anticorpo UIC2-PE.

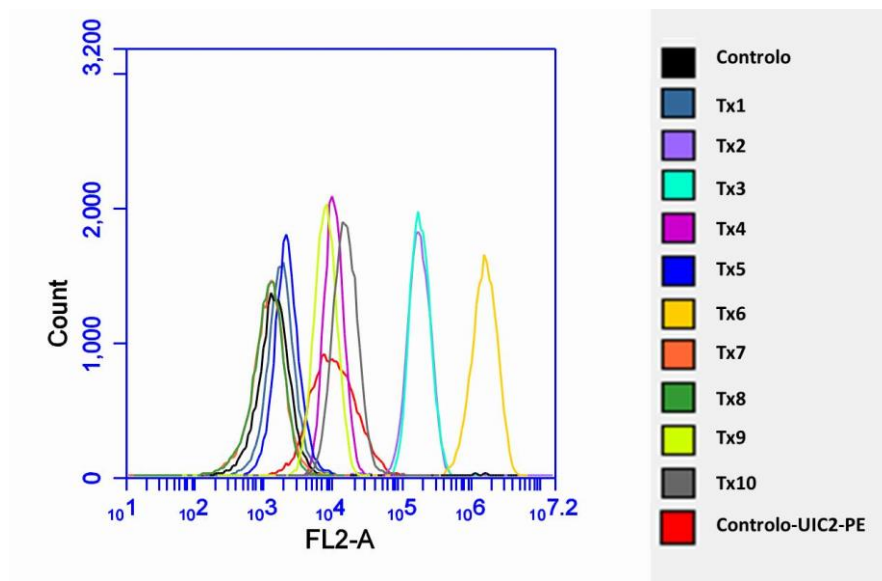


Figura 36. Histogramas representativos da análise, por citometria de fluxo, da autofluorescência de células Caco-2 no filtro de 585 ± 40 nm (detetor FL2), 24 h após incubação com os derivados xantônicos ($20,0 \mu\text{M}$). A preto e a vermelho encontram-se igualmente representadas a autofluorescência de células controlo ($0 \mu\text{M}$) e a fluorescência de células controlo ($0 \mu\text{M}$) incubadas com UIC2-PE, respetivamente.

4.2.2. Efeito modulador da P-gp dos derivados Xantônicos

A avaliação da capacidade dos derivados xantônicos para modular a atividade da P-gp foi efetuada por duas metodologias distintas, sendo que em ambos os protocolos experimentais se utilizou RHO 123 como substrato fluorescente da P-gp (Silva et al., 2015a; Silva et al., 2014b; Vilas-Boas et al., 2013b) e ZOS como inibidor específico de terceira geração (Silva et al., 2015b).

Primeiramente foi utilizado o protocolo A, em que as células Caco-2 foram expostas aos derivados xantônicos ($20 \mu\text{M}$) durante os 90 min de incubação com o substrato fluorescente (RHO 123, $10 \mu\text{M}$). O intuito deste protocolo foi avaliar o potencial efeito imediato dos compostos em estudo na atividade da P-gp, como resultado da inibição ou ativação direta da proteína. No protocolo B, foi avaliada a acumulação da RHO 123 ($10 \mu\text{M}$) em células Caco-2 pré-expostas aos derivados xantônicos ($20 \mu\text{M}$) durante 24 h, com o propósito de avaliar a potencial alteração da atividade da P-gp resultante de uma potencial alteração da expressão da proteína. Em ambos protocolos experimentais, foi

avaliada a acumulação da RHO 123 na ausência e presença de ZOS (5 μM). Deste modo, a atividade da P-gp foi avaliada pelo rácio entre a intensidade de fluorescência (IF) depois da inibição da acumulação de RHO 123 (AI – na presença de ZOS) e a IF da acumulação da RHO 123 em condições normais (AN – na ausência de ZOS), sendo os resultados expressos como percentagem relativa aos resultados obtidos com as células controlo (0 μM). Deste modo, um inibidor, ao reduzir a atividade da P-gp, levaria a uma redução do efluxo de RHO 123, e à consequente acumulação da mesma intracelularmente, que se traduzia num aumento da intensidade de fluorescência de AN. Assim, como o IF_{AN} seria mais elevado o ratio IF_{AI}/IF_{AN} seria menor. Pelo contrário, um ativador, ao aumentar a atividade da P-gp, o rácio IF_{AI}/IF_{AN} seria superior, visto que a intensidade da fluorescência seria menor (menor IF_{AN}), devido ao aumento de efluxo de RHO 123 e consequente redução da sua acumulação intracelular (Silva et al., 2015a).

Nos estudos realizados com protocolo A demonstrou-se, como representado na Figura 37, a ausência de diferenças significativas na atividade da P-gp quando as células Caco-2 foram expostas aos compostos X4, X5 e X6 durante a acumulação com o substrato fluorescente, e comparativamente com as células controlo (0 μM). O mesmo não se demonstrou para os compostos X1 e X7, em que houve um aumento e uma diminuição significativa da atividade da P-gp, respetivamente, comparativamente com as células controlo (0 μM). De fato, a incubação das células Caco-2 com X1 durante a acumulação com a RHO 123 resultou num aumento significativo da atividade da P-gp para 108 %. Por outro lado, o composto X7 reduziu significativamente a atividade da P-gp para 74 %, demonstrando um potencial inibitório da proteína.

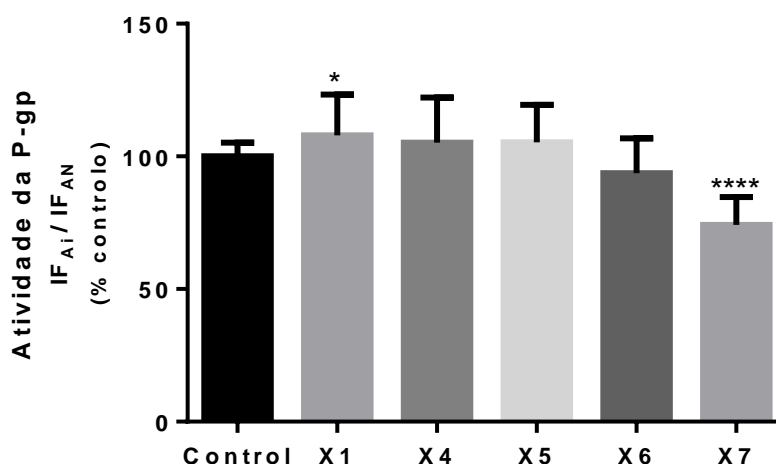


Figura 37. Atividade da glicoproteína-P avaliada por espectroscopia de fluorescência em células Caco-2 expostas aos derivados xantônicos (20 μM) apenas durante os 90 minutos do período de incubação com o substrato fluorescente (RHO 123, 10 μM). Os resultados são apresentados como média \pm SD de 7 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett [* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ vs. controle (0 μM)].

Nos estudos realizados com protocolo B, verificou-se, como representado na Figura 38, a ausência de diferenças significativas na atividade da P-gp quando as células Caco-2 foram pré-expostas (24 h) aos compostos X1, X5, X6, comparativamente com as células controle (0 μM). O mesmo não se demonstrou para os compostos X4 e X7, em que houve uma diminuição significativa da atividade da P-gp em células pré-expostas (24 h) a X4 e X7, comparativamente às células controle (0 μM) (a expressão da P-gp reduziu significativamente para 75 % e 68 %, 24 h após exposição a X4 e X7, respetivamente). Desta forma, percebeu-se que os compostos X4 e X7 apresentam potencial para inibir a P-gp e, assim, procedeu-se à seleção destes dois compostos para os ensaios subsequentes (ensaio de avaliação dos seus efeitos na expressão da P-gp e ensaio de avaliação do seu efeito na citotoxicidade da daunorrubicina e quinidina). Embora tenham sido encontradas diferenças significativas e imediatas na atividade da P-gp para o composto X1, comparativamente às células controle (0 μM) (Figura 37), não foi avaliado o seu efeito na expressão da P-gp, dada a ausência de efeitos na atividade da proteína 24 h após exposição. Do mesmo modo, não foi igualmente avaliado o seu efeito na citotoxicidade de

um substrato tóxico da P-gp (DAU), pelo facto de o aumento imediato observado na atividade da proteína ter sido muito ligeiro [o aumento da atividade da P-gp em células expostas a este composto não foi superior a 115 % (controlo 100 %)].

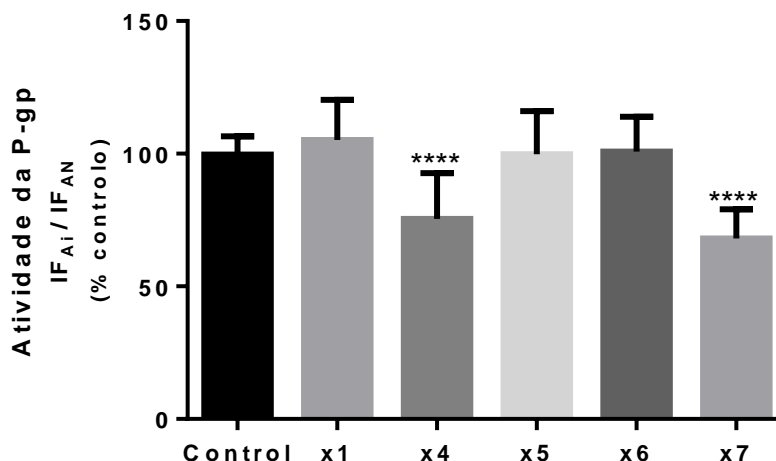


Figura 38. Atividade da glicoproteína-P avaliada por espectroscopia de fluorescência em células Caco-2 pré-expostas aos derivados xantônicos (20 µM) durante 24 h. Os resultados são apresentados como média ± SD de 5 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnett's multiple comparisons test* [*** $p < 0,001$ vs. controlo (0 µM)].

Prosseguiu-se, então, para o ensaio de avaliação da expressão da P-gp com os dois compostos (X4 e X7) previamente selecionados. A capacidade dos derivados xantônicos (X4 e X7) para aumentar ou diminuir a expressão da P-gp em células Caco-2 foi avaliada por citometria de fluxo, usando o anticorpo UIC2-PE, 24 h após a exposição das células Caco-2 aos derivados xantônicos (20 µM), como descrito em estudos prévios (Martins et al., 2019; Silva et al., 2014b). Tal como indicado na Figura 39, não se verificaram diferenças significativas na expressão da P-gp 24 h após exposição das células Caco-2 ao composto X7, comparativamente com as células controlo (0 µM). Pelo contrário, em células Caco-2 pré-expostas (24 h) ao composto X4, verificou-se uma redução significativa da expressão da P-gp (para 84 %), em comparação com as células controlo (0 µM, 100 %).

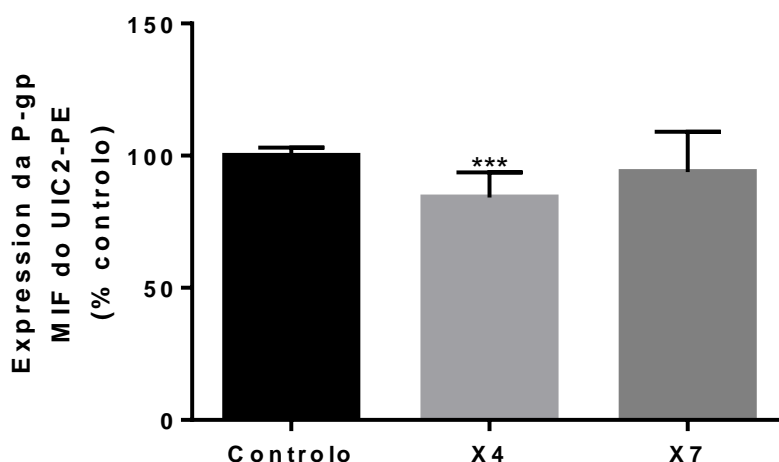


Figura 39. Níveis de expressão de P-gp em células Caco-2 expostas aos derivados xantônicos X4 e X7 (20 μ M) durante 24 h. Os resultados são apresentados como média \pm SD de 5 experiências independentes (realizadas em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnett's multiple comparisons test* [*** $p < 0,001$ vs. controlo (0 μ M)].

Assim, a redução da atividade da P-gp verificada quando as células Caco-2 foram expostas ao composto X4 durante 24 h (Figura 38) parece resultar da diminuição significativa da expressão da proteína (Figura 39). Relativamente ao composto X7 não se verificou qualquer efeito significativo na expressão da P-gp, apesar de se ter verificado uma redução significativa da atividade da proteína, 24 h após exposição ao composto (Figura 38). Neste caso, e ao contrário do verificado para o X4, a redução da atividade da P-gp não é decorrente de uma redução da expressão da proteína, mas sim de uma inibição direta da P-gp, tal como verificado no ensaio de avaliação da atividade da P-gp em células Caco-2 incubadas com X7 durante a acumulação com o substrato fluorescente da P-gp (Figura 37). Deste modo, os resultados obtidos sugerem o X4 e X7 como potenciais inibidores da expressão e/ou atividade da proteína.

No estudo de Silva et al. (2014b), analisou-se a capacidade de derivados xantônicos dihidroxilados para modelar a P-gp. Para esse efeito, realizaram-se estudos de avaliação da expressão e atividade da P-gp idênticos ao utilizados no presente estudo, tendo os compostos sido considerados ativadores e indutores da P-gp, por aumentarem significativamente a atividade e expressão da proteína (Silva et al., 2014b). Pelo contrário, os resultados obtidos no presente estudo

permitiram identificar derivados xantônicos com capacidade inibitória da P-gp (X4 e X7), e um derivado, X1, que causou um ligeiro, mas significativo aumento imediato da atividade da P-gp. Outro estudo realizado com o mesmo propósito, usando igualmente as células Caco-2 como modelo *in vitro*, identificou derivados xantônicos oxigenados (20 μ M) com capacidade de aumentar e reduzir a expressão da proteína 24 h após exposição (OX4 e OX1, respetivamente) e 5 derivados dos 6 derivados testados demonstraram a capacidade de aumentar significativamente a atividade da P-gp de forma rápida e imediata, tendo sido descritos como ativadores da P-gp (Martins et al., 2019), em contraste ao encontrado no presente estudo. Tais diferenças no efeito destes derivados xantônicos na atividade e expressão da P-gp pode estar relacionado com o tipo de substituintes adicionados a estes derivados aquando da sua síntese, que podem alterar a afinidade dos compostos em estudo às diferentes regiões da proteína. Como descrito previamente no estudo de Tchamo et al. (2000), a substituição hidrofóbica do anel A, por prenilação, nas posições 2 e 4 das xantonas, promove um aumento na afinidade para a região hidrofóbica da proteína, perto do local de ligação do ATP, podendo consequentemente levar à inibição da proteína, o mesmo não se verificando para a posição 1. Assim, as diferenças (inibição/ ativação/ indução/ sem efeito) encontradas nos efeitos dos derivados xantônicos na atividade e expressão da P-gp, intra e entre estudos, pode ser explicada pelos diferentes substituintes usados nas xantonas produzidas.

4.2.3. Efeito modulador da P-gp dos derivados Tioxantônicos

Procedeu-se, igualmente, à avaliação da capacidade dos derivados tioxantônicos Tx1, Tx5, Tx7, Tx8, Tx9 e Tx10 para modular a atividade da P-gp por duas metodologias distintas sendo que, em ambos os protocolos experimentais, e tal como referido para os ensaios com os derivados xantônicos, foi utilizada a RHO 123 como substrato fluorescente da P-gp e ZOS como inibidor específico de terceira geração.

De modo semelhante ao realizado nos ensaios com os derivados xantônicos, foi primeiramente utilizado o protocolo A, em que as células Caco-2 foram expostas aos derivados tioxantônicos (20 μM) durante os 90 min de incubação com o substrato fluorescente (RHO 123, 10 μM). O objetivo deste protocolo seria avaliar o potencial efeito imediato dos derivados tioxantônicos na atividade da P-gp, como resultado da inibição ou ativação direta da proteína. Posteriormente, foi utilizado o protocolo B, em que foi avaliada a acumulação da RHO 123 (10 μM) em células Caco-2 pré-expostas aos derivados tioxantônicos (20 μM) durante 24 h. O objetivo, tal como referido anteriormente, consistia em avaliar a potencial alteração da atividade da P-gp resultante de uma potencial alteração da expressão da proteína. Os resultados obtidos foram avaliados de igual modo ao realizado nos ensaios com os derivados xantônicos.

Segundo os resultados obtidos após a realização do protocolo A (Figura 40), após exposição aos derivados tioxantônicos durante os 90 min do período de incubação com a RHO 123, verificou-se a ausência de diferenças significativas na atividade da P-gp em células Caco-2 expostas ao TX5 comparativamente às células controlo (0 μM). Por outro lado, a incubação das células Caco-2 com Tx1 e Tx10 resultou num ligeiro, mas significativo, aumento da atividade da P-gp (116 e 104 %, respetivamente). Pelo contrário, os compostos Tx7, Tx8 e Tx9 causaram uma diminuição significativa da atividade da P-gp (para 82, 85 e 92 %, respetivamente), em comparação com as células controlo (0 μM). Assim, os compostos Tx7, Tx8 e Tx9 podem ser encarados como potenciais inibidores da P-gp, enquanto que os compostos TX1 e Tx10 demonstraram um potencial ativador da proteína.

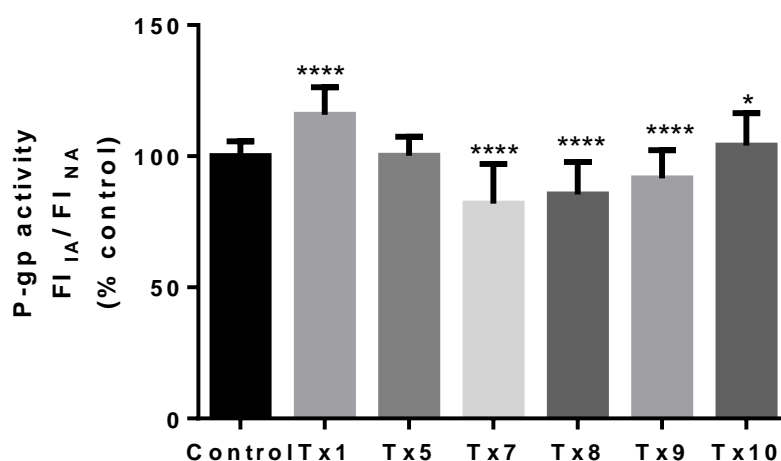


Figura 40. Atividade da glicoproteína-P avaliada por espectroscopia de fluorescência em células Caco-2 expostas aos derivados tioxantônicos (20 μ M) apenas durante os 90 minutos do período de incubação com o substrato fluorescente (RHO 123, 10 μ M). Os resultados são apresentados como média \pm SD de pelo menos 4 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett [* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ vs. controle (0 μ M)].

Na realização do protocolo B (Figura 41), com pré-exposição aos derivados tioxantônicos (20 μ M) durante 24 h, verificou-se a ausência de diferenças significativas na atividade da P-gp em células Caco-2 incubadas com TX1, Tx5, Tx7, Tx8 e Tx10, comparativamente com as células controle (0 μ M). O mesmo não se verificou para o composto Tx9, em que ocorreu uma redução ligeira, mas significativa, da atividade da proteína (para 88 %).

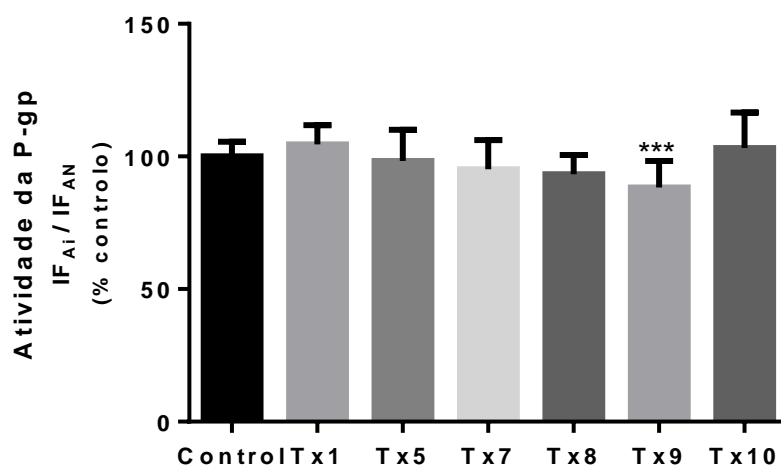


Figura 41. Atividade da glicoproteína-P avaliada por espectroscopia de fluorescência em células Caco-2 pré-expostas aos derivados tioxantônicos (20 μ M) durante 24 h. Os resultados são apresentados como média \pm SD de 5 experiências independentes, realizadas em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnett's multiple comparisons test* [*** $p < 0,001$ vs. controle (0 μ M)].

A capacidade dos derivados tioxantônicos para aumentar ou diminuir a expressão da P-gp em células Caco-2 foi avaliada por citometria de fluxo (usando o anticorpo UIC2-PE), 24 h após a exposição das células Caco-2 aos derivados tioxantônicos (Tx1 e Tx5, 20 μ M), tal como descrito em estudos prévios (Lopes et al., 2018; Silva et al., 2015a). Demonstrou-se, tal como pode ser observado na Figura 42, a ausência de diferenças significativas na expressão da P-gp em células pré-expostas ao composto TX5 durante 24 h, comparativamente com as células controlo (0 μ M). Pelo contrário, o composto TX1 causou uma redução significativa na expressão da P-gp (para 83 %) em comparação com as células controlo (0 μ M, 100 %).

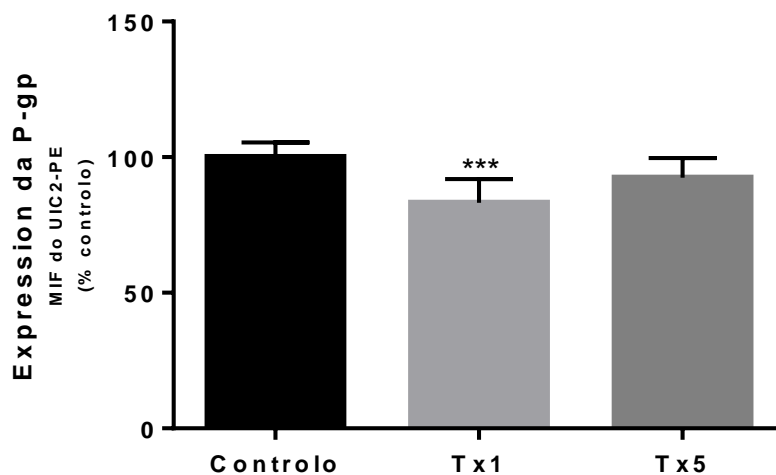


Figura 42. Níveis de expressão de P-gp em células Caco-2 expostas a Tx1 e Tx5 (20 μ M) durante 24 h. Os resultados são apresentados como média \pm SD de 3 experiências independentes (realizadas em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método paramétrico de One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnnett's multiple comparisons test* [*** p < 0,001 vs. controlo (0 μ M)].

Assim, apesar de o composto Tx1 reduzir significativamente a expressão da P-gp em células Caco-2, 24 h após exposição (Figura 42), essa diminuição não se traduziu numa diminuição concomitante da atividade da proteína (Figura 41). Uma possível explicação para esse resultado poderá ser uma eventual contribuição da ativação da proteína pelo composto que possa permanecer intracelularmente, tal como verificado no ensaio de avaliação da atividade da P-

gp em células Caco-2 incubadas com Tx1 durante a acumulação com o substrato fluorescente da P-gp (Figura 40).

Por outro lado, a diminuição da atividade da P-gp observada em células Caco-2 pré-expostas ao Tx9 durante 24 h pode ser justificada pela inibição direta da atividade da proteína mediada pelo composto que possa permanecer no interior das células, em concordância com o verificado no ensaio de avaliação do efeito imediato dos compostos na atividade da P-gp (Figura 40). Por outro lado, não se pode excluir uma possível contribuição de uma diminuída expressão da P-gp para a diminuição da atividade da proteína 24 h após exposição ao Tx9, uma vez que a sua fluorescência inviabilizou a avaliação dos seus efeitos na expressão da proteína. Estes estudos permitiram também verificar a necessidade futura de proceder a outras metodologias para avaliar os níveis de expressão da P-gp nomeadamente a utilização do western blotting (Silva et al., 2015a). Por outro lado, para o derivado Tx5, não se verificaram quaisquer diferenças significativas nem na expressão nem na atividade da P-gp, 24 h após exposição. De salientar que para os compostos Tx7 e Tx8, apesar de não se ter verificado qualquer interferência na fluorescência do anticorpo UIC2-PE, não foi avaliado o seu efeito na expressão da P-gp dada a ausência de efeitos na atividade da proteína 24 h após exposição (Figura 41).

Com base nos resultados obtidos relativamente à capacidade dos derivados tioxantónicos para modificar a expressão e atividade da P-gp, foi selecionado o composto Tx7 para os ensaios subseqüente de avaliação do efeito destes compostos na citotoxicidade de um substrato tóxico da P-gp, a daunorrubicina (DAU). Essa seleção justifica-se pelo fato de o Tx7 ter demonstrado o efeito inibitório direto mais significativo na atividade da P-gp (Figura 40). Lopes et al. (2018) estudou a capacidade moduladora de tioxantonas quirais na atividade e expressão da P-gp, com protocolos idênticos aos realizados no presente estudo, adotando igualmente as células Caco-2 como modelo *in vitro*, tendo-se verificado que um dos compostos em estudo possuía a capacidade de aumentar a expressão da P-gp (ATx2), que todos os compostos em estudo promoviam um aumento direto e imediato da atividade da P-gp, demonstrando potencial ativador, e que apenas um dos compostos não possuía

capacidade de aumentar a atividade da P-gp 24 h após exposição. Assim, este estudo identificou novas tioxantonas quirais como indutores e ativadores da P-gp (Lopes et al., 2018). De forma idêntica ao estudo anterior, Silva et al. (2015a) avaliou a capacidade moduladora de novos derivados tioxantônicos na atividade e expressão da P-gp, onde se verificou que todos os compostos em estudo tinham a capacidade de aumentar significativamente a expressão e atividade da P-gp, ou seja que atuam como indutores e ativadores da proteína (Silva et al., 2015a). A diferença nos efeitos observados na atividade e/ou expressão da P-gp entre os artigos descritos e o presente estudo pode, à semelhança do referido para os derivados xantônicos, ser explicada pelos diferentes substituintes inseridos no esqueleto tioxantônico, aquando da sua síntese.

Resultados opostos aos acima descritos foram observados por Palmeira et al. (2012b) em células K562, identificando novos derivados tioxantônicos como inibidores duplos não competitivos da atividade da P-gp e do crescimento celular. O presente estudo, apesar de usar um modelo *in vitro* distinto, é concordante com o estudo de Palmeira et al. (2012b), uma vez que foram identificados derivados tioxantônicos com capacidade inibitória da atividade da P-gp. Destaca-se, assim, a importância dos substituintes adicionados aos derivados tioxantônicos aquando da sua síntese, ao existir a possibilidade de alterar a capacidade de modulação da atividade e expressão da P-gp.

4.3. Efeito dos derivados (Tio)Xantônicos na citotoxicidade de substratos da P-gp

Como previamente referido, a P-gp tem uma elevada influência na absorção e excreção intestinal de endobióticos e xenobióticos, particularmente fármacos, limitando desta forma a chegada destes compostos aos seus órgãos alvo (Estudante et al., 2013; Szakacs et al., 2008; Yoshida et al., 2013).

Assim, o aumento da atividade e/ou expressão da P-gp vai promover a redução da absorção de compostos usados na terapêutica (anticancerígenos,

antidepressivos, antipsicóticos, analgésicos, etc.) e, conseqüentemente, causar um aumento da excreção dos mesmos, podendo levar a uma redução da sua eficácia terapêutica (doses administradas não chegam ao órgão alvo devido à sua excreção pela P-gp). No entanto, este aumento da atividade e/ou expressão da P-gp tem igualmente um papel extremamente relevante a nível clínico e forense, devido ao seu papel protetor em casos de intoxicação, promovendo uma menor acumulação intracelular de substratos tóxicos da P-gp, reduzindo significativamente a sua toxicidade (Martins et al., 2019; Silva et al., 2015a; Silva et al., 2014b).

Por outro lado, a diminuição da atividade e/ou expressão da P-gp vai promover uma redução da excreção dos seus substratos, podendo levar ao aumento da eficácia terapêutica de anticancerígenos, ao inibir o seu efluxo das células cancerígenas (Zhang et al., 2018), assim como de antidepressivos, analgésicos, antipsicóticos entre outros, ao promover uma maior acumulação desses compostos nos seus órgãos alvo (Gameiro et al., 2017; Linnet and Ejsing, 2008). Deste modo, compostos inibidores da atividade e/ou expressão da P-gp tornam-se bastante relevantes a nível clínico e forense, ao poder promover a reversão do fenómeno de MDR, aumentando a eficácia terapêutica dos compostos acima referidos, que estão associados a casos forenses extremos de suicídio, homicídio e intoxicações (Bastos and Galante, 1976; Belli et al., 2010; Boiso Moreno et al., 2013; Rahikainen et al., 2018).

Por este motivo, torna-se extremamente relevante perceber se estes potenciais moduladores encontrados (X4, X7 e Tx7) conseguem limitar o efluxo de substratos conhecidos da P-gp, podendo a administração conjunta de um destes compostos com um substrato conhecido da P-gp ser hipoteticamente utilizada como estratégia terapêutica no sentido da reversão do fenómeno de MDR, aumentando a eficácia terapêutica desses substratos. Assim, pretende-se confirmar se a modulação da P-gp mediada pelos compostos em estudo (X4, X7 e Tx7), nomeadamente a sua capacidade para reduzir a expressão e/ou atividade da proteína, se traduz no agravamento da citotoxicidade causada pela DAU e pela quinidina, substratos conhecidos da P-gp (Sharom, 2008).

4.3.1. Efeito dos derivados (Tio)xantônicos na citotoxicidade da Daunorrubicina

Com o propósito acima referido, foi avaliado se a redução da expressão e atividade da P-gp mediada pelo composto X4, a redução da atividade da P-gp mediada pelo X7 e a redução da atividade da P-gp mediada pelo Tx7, se traduzia no agravamento da citotoxicidade da DAU, em células Caco-2. Nos presentes ensaios, o ZOS foi usado como controlo positivo de inibição potente e específica da P-gp (Palmeira et al., 2012a). Para tal, as células Caco-2 foram incubadas com o substrato, DAU, usando 2 protocolos experimentais distintos: 1) incubação de 4 h com DAU (0, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75, 100 μM), com a sua remoção posterior e adição de meio de cultura fresco na presença ou ausência de X4 (20 μM), X7 (20 μM), Tx7 (20 μM) ou ZOS (5 μM) num período de 20 h; 2) pré-exposição aos compostos X4 (20 μM), X7 (20 μM) ou ZOS (5 μM) durante 24 h, seguida da sua remoção, incubação de 4 h com DAU (0, 5, 10, 25, 50 μM) e posterior remoção do substrato, com adição de meio fresco isento de substrato e compostos, e incubação durante 20 h. O protocolo 1 foi realizado separadamente para as xantonas (X4, X7) e tioxantona (Tx7) e, por este motivo, os resultados obtidos serão apresentados separadamente. Por outro lado, o protocolo 2 foi apenas realizado para dos derivados xantônicos (X4, X7) e ZOS. De salientar que o reduzido tempo de incubação com a DAU (4 h) usado nos dois protocolos experimentais é justificado pelo fato de este composto ser um conhecido indutor da P-gp (Silva et al., 2015b) e, selecionando um curto período de incubação, se minimizar esse efeito nos resultados obtidos.

Na realização do protocolo 1 com os **derivados xantônicos**, os resultados obtidos demonstraram a ausência de diferenças significativas na incorporação do NR para as condições DAU + X4 e DAU + X7, para todas as concentrações de DAU testadas, e comparativamente com as células incubadas apenas com o substrato da P-gp (DAU) (Figura 43). Como consequência, não se verificaram diferenças significativas entre valores de IC_{50} (concentração que causa metade do efeito máximo) das curvas traçadas (25,05, 23,88 e 26,18 μM para DAU, DAU + X4 e DAU + X7, respetivamente) (Tabela 6). Deste modo, nenhum dos derivados

xantônicos foi capaz de aumentar a citotoxicidade do substrato da P-gp, ao contrário do espectável dada a sua capacidade para reduzir a expressão e/ou atividade da proteína.

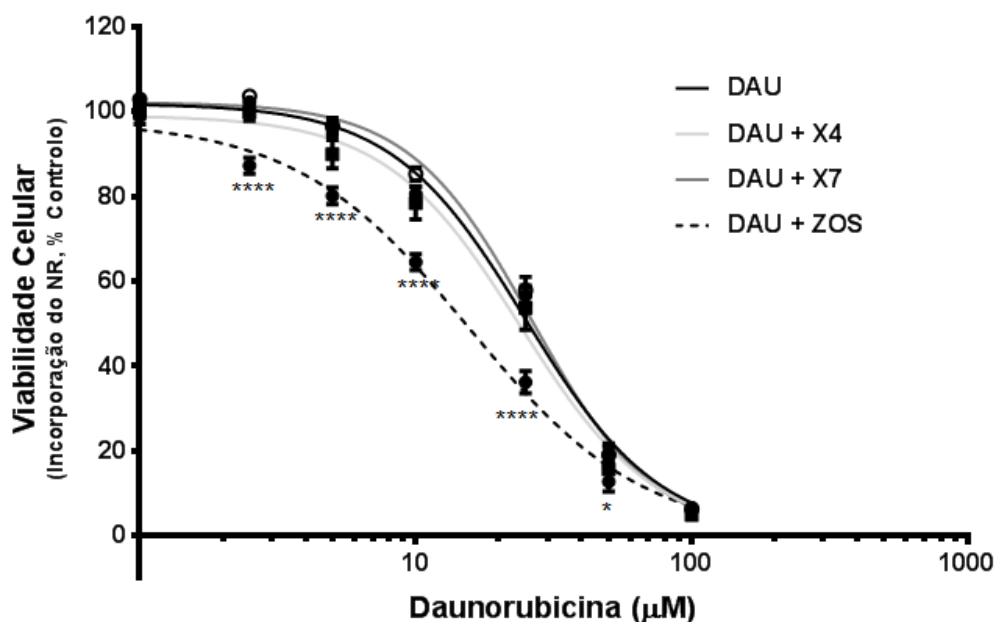


Figura 43. Citotoxicidade da Daunorubicina (0 – 100 µM) avaliada, em células Caco-2, pelo ensaio da incorporação do NR, 24 h após exposição ao substrato da P-gp. As células Caco-2 foram expostas a DAU durante 4 h, a qual foi posteriormente removida e substituída por meio de cultura fresco na presença ou ausência de X4 (20 µM), X7 (20 µM) ou ZOS (5 µM) durante 20 h. Os resultados são apresentados como média ± SEM de 5 experiências independentes (realizadas em triplicado). As curvas de concentração-resposta (viabilidade celular, % incorporação do NR) foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados como método de fitting e as comparações entre as curvas DAU e DAU + X4, DAU + X7 e DAU + ZOS (LOG IC₅₀, TOP, BOTTOM e Hill Slope) foram feitas usando o *extra sum-of-squares F test*. As comparações estatísticas foram efetuadas usando Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparisons test* (** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001 DAU + X4, DAU + X7 ou DAU + ZOS vs. DAU). Em todos os casos, valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Por outro lado, para as células expostas na condição DAU + ZOS, verificou-se uma redução significativa na incorporação de NR para todas as concentrações de DAU testadas, à exceção da concentração mais elevada (100 µM), e comparativamente com as células incubadas apenas com o substrato (DAU). O aumento significativo da citotoxicidade da DAU traduziu-se num deslocamento da curva DAU + ZOS para a esquerda e, conseqüentemente, numa diminuição significativa no valor de IC₅₀ da curva traçada (25,05 e 15,63 µM para DAU e DAU + ZOS, respetivamente) (Tabela 6).

Tabela 6. Valores IC₅₀ (concentração que causa metade do efeito máximo), TOP (efeito máximo), BOTTOM (linha de base) e Hill Slope das curvas de concentração-resposta da Daunorrubicina (DAU), com (DAU + X4, X7 ou ZOS) ou sem (DAU) exposição posterior às xantonas X4 e X7 (20 µM) ou ZOS (5 µM).

	DAU	DAU + X4	DAU + X7	DAU + ZOS
IC₅₀ (µM)	25.05	23.88	26.18	15.63****
TOP	101.9	99.13	102.2	97.87
(viabilidade celular máxima,% controlo)				
BOTTOM	~ 1.678e-016	~ 1.371e-016	~ 1.771e-016	~ 1.847e-016
(linha de base, % controlo)				
Hill Slope	-1.799	-1.783	-1.967	-1.384**
Valor de p	-	0.2652	0.5682	< 0,0001
(comparação entre as curvas traçadas)				

As curvas de concentração-resposta (viabilidade celular, % incorporação do NR) foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados como método de fitting e as comparações entre as curvas DAU e DAU + X4, DAU + X7 ou DAU + ZOS (LOG IC₅₀, TOP, BOTTOM e Hill Slope) foram efetuadas usando o *extra sum-of-squares F test*. Em todos os casos, valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos (** p <0,01; **** p <0,0001 DAU + ZOS vs. DAU).

Na realização do protocolo 1 com o **derivado tioxantónico**, não se verificaram diferenças significativas na citotoxicidade da DAU, avaliada pelo ensaio de incorporação do NR, para todas as concentrações testadas, e comparativamente com as células incubadas apenas com o substrato da P-gp (Figura 44). Consequentemente, não se verificaram diferenças significativas nos valores de IC₅₀ das curvas traçadas (24,28 e 25,80 µM para DAU e DAU + Tx7, respetivamente), demonstrando a ausência de impacto deste derivado tioxantónico na citotoxicidade da DAU. Por outro lado, e à semelhança dos resultados anteriores, a exposição das células Caco-2 na condição DAU + ZOS, resultou numa diminuição significativa na incorporação do NR para as concentrações de DAU de 1 a 50 µM (traduzindo uma diminuição na viabilidade celular, logo uma aumentada citotoxicidade do substrato), quando comparado

com células incubadas apenas com o substrato (Tabela 7). Consequentemente, verificou-se uma diminuição significativa no valor de IC₅₀ das curvas traçadas (24,28 e 14,78 μM para DAU e DAU + ZOS, respectivamente) (Tabela 7)

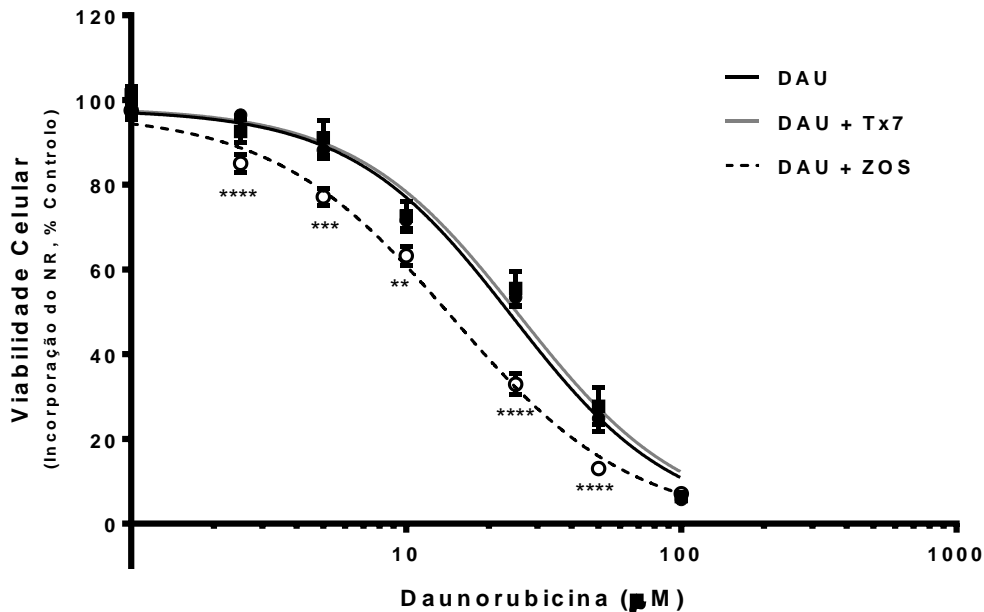


Figura 44. Citotoxicidade da Daunorubicina (0 – 100 μM) avaliada, em células Caco-2, pelo ensaio da incorporação do NR, 24 h após exposição ao substrato da P-gp. As células Caco-2 foram expostas a DAU durante 4 h, a qual foi posteriormente removida e substituída por meio de cultura fresco na presença ou ausência de Tx7 (20 μM) ou ZOS (5 μM) durante 20 h. Os resultados são apresentados como média ± SEM de 3 experiências independentes (realizadas em triplicado). As curvas de concentração-resposta (viabilidade celular, % incorporação do NR) foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados como método de fitting e as comparações entre as curvas DAU e DAU + Tx7 e DAU + ZOS (LOG IC₅₀, TOP, BOTTOM e Hill Slope) foram feitas usando o *extra sum-of-squares F test*. As comparações estatísticas foram efetuadas usando Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparisons test* (** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001 DAU + Tx7 ou DAU + ZOS vs. DAU). Em todos os casos, valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Tabela 7. Valores IC₅₀ (concentração que causa metade do efeito máximo), TOP (efeito máximo), BOTTOM (linha de base) e Hill Slope das curvas de concentração-resposta da Daunorrubicina (DAU), com (DAU + Tx7 ou ZOS) ou sem (DAU) exposição posterior à Tx7 (20 µM) ou ZOS (5 µM).

	DAU	DAU + Tx7	DAU + ZOS
IC₅₀ (µM)	24.28	25.80	14.78****
TOP (viabilidade celular máxima, % controlo)	97.83	98.24	96.99
BOTTOM (linha de base, % controlo)	~ 1.580e-016	2.096e-011	~ 1.955e-016
Hill Slope	-1.475	-1.445	-1.334
Valor de p (comparação entre as curvas traçadas)	-	0.9269	< 0,0001

As curvas de concentração-resposta (viabilidade celular, % incorporação do NR) foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados como método de fitting e as comparações entre as curvas DAU e DAU + Tx7 ou DAU + ZOS (LOG IC₅₀, TOP, BOTTOM e Hill Slope) foram efetuadas usando o *extra sum-of-squares F test*. Em todos os casos, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (**** $p < 0,0001$ DAU + ZOS vs. DAU).

Estudos prévios realizados com derivados xantónicos e tioxantónicos semelhantes, descreveram estes compostos como ativadores e indutores da P-gp, e verificaram a sua capacidade protetora contra a citotoxicidade do paraquato (PQ), efeito esse revertido mediante inibição da P-gp (Silva et al., 2015a; Silva et al., 2014b). Assim, no presente protocolo, tendo os compostos X4, X7 e Tx7 demonstrado capacidade para reduzir a expressão e/ou atividade da P-gp, seria expectável haver um agravamento da citotoxicidade da DAU, o que não se verificou. De modo a esclarecer de que forma estes compostos poderiam agravar a citotoxicidade da DAU, foi realizado um segundo protocolo experimental. Dado que o X4 apenas reduziu a expressão e atividade da P-gp 24 h após exposição, foi colocada a hipótese de nos resultados anteriormente

descritos não existir um tempo de incubação suficiente com os derivados xantônicos para se alcançar a modulação máxima da expressão e atividade da proteína. Deste modo, na realização do protocolo 2, as células foram pré-expostas aos compostos em estudo (X4 e X7), assim como com o inibidor (ZOS), durante 24 h e só posteriormente incubadas com DAU durante 4h. Demonstrou-se que para as células expostas a DAU + X4 houve uma diminuição significativa na incorporação do NR para todas as concentrações em estudo, comparativamente com as células incubadas apenas com DAU (na condição DAU + X4, a % de incorporação do NR reduziu para 80, 70, 38 e 7 % para as concentrações de DAU de 5, 10, 25 e 50 μM , respetivamente, quando comparado com as % de incorporação do NR de 90, 80, 52 e 15 %, respetivamente, obtidas quando as células foram incubadas apenas com DAU) (Figura 45). Para células expostas a DAU + X7, verificou-se uma redução significativa da incorporação do NR para a maioria das concentrações em estudo (5, 10 e 25 μM), exceto para concentração mais alta testada, 50 μM , e comparativamente com células incubadas apenas com DAU (na condição DAU + X7, a % de incorporação do NR reduziu para 82, 71 e 40 % para as concentrações de DAU de 5, 10 e 25 μM , respetivamente, quando comparado com 90, 80 e 52 %, respetivamente, observado quando as células foram incubadas apenas com DAU) (Figura 45). O mesmo se verificou para a condição DAU + ZOS, tendo as diferenças na incorporação do NR sido mais acentuadas e ocorrendo para todas as concentrações testadas (5, 10, 25 e 50 μM), comparativamente com as células incubadas apenas com o substrato (DAU). De facto, na condição DAU + ZOS, a % de incorporação do NR reduziu para 54, 47, 15 e 3 % para as concentrações de DAU de 5, 10, 25 e 50 μM , respetivamente, quando comparado com 90, 80, 52 e 15 %, respetivamente, observado quando as células foram incubadas apenas com DAU (Figura 45).

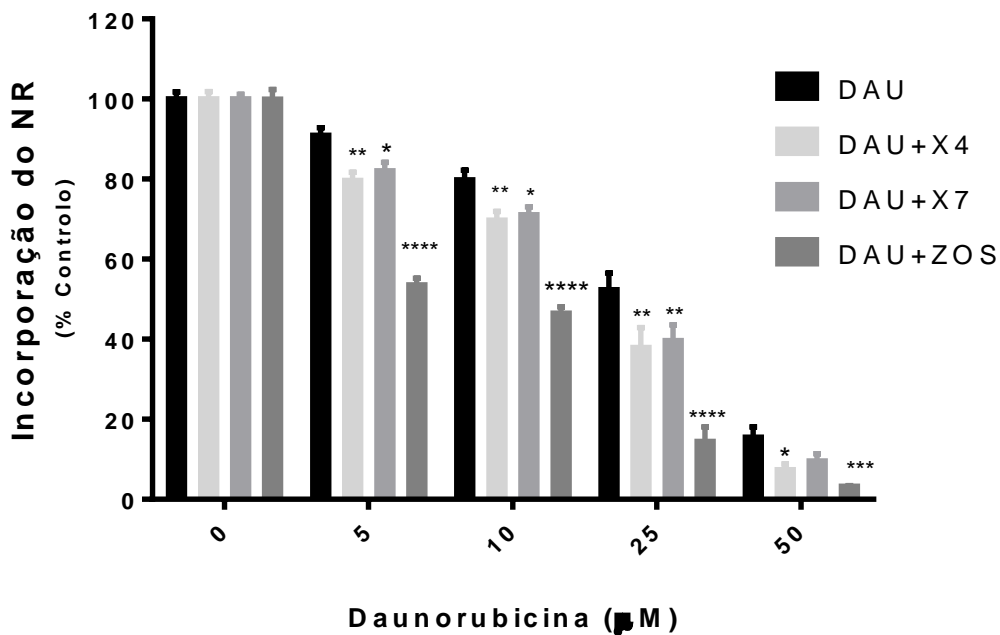


Figura 45. Citotoxicidade da Daunorubicina (0 – 50 µM) avaliada, em células Caco-2, pelo ensaio da incorporação do NR, 24 h após exposição ao substrato da P-gp. As células Caco-2 foram pré-expostas a X4 (20 µM), X7 (20 µM) ou ZOS (5 µM) durante 24 h, seguido da exposição a DAU durante 4 h, a qual foi posteriormente removida do meio de cultura e substituída por meio de cultura fresco (24 h X4, X7 ou ZOS + 4 h DAU + 20 h meio de cultura). Os resultados são apresentados como média ± SD de 4 experiências independentes (realizadas em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método de Two-way ANOVA, seguido pelo Sidak's multiple comparisons test [**p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001 DAU + X4, X7 ou ZOS vs. DAU].

Assim, verificou-se que nestas condições experimentais os compostos X4 e X7 apresentaram a capacidade de agravar a citotoxicidade da DAU, em concordância com a sua capacidade para reduzir a expressão e/ou atividade da P-gp. Tornou-se, assim, relevante a realização de mais estudos com estes derivados xantônicos para melhor compreensão da diferença observada nos resultados obtidos pelos dois protocolos experimentais. Nesse sentido foi realizado um ensaio de avaliação do impacto do X4 e X7 na citotoxicidade de um outro substrato da P-gp, a quinidina.

4.3.2. Efeito dos derivados xantônicos X4 e X7 na citotoxicidade da quinidina

Com o mesmo propósito do ensaio anterior, foi avaliado se a diminuição da atividade e/ou expressão da P-gp mediada pelos compostos X4 e X7 se traduzia no agravamento da citotoxicidade da quinidina, um conhecido substrato da P-gp (Sharom, 2008). Para este efeito, as células Caco-2 foram expostas à quinidina (0, 50, 100, 150 e 200 μM) durante 24 h, na presença ou ausência dos compostos em estudo (X4 e X7, 20 μM) ou do inibidor específico da P-gp, zosuquidar (ZOS, 5 μM). Vinte e quatro horas após exposição, foi avaliada a citotoxicidade da quinidina pelo ensaio de incorporação do NR.

Como se pode verificar pela análise da Figura 46, a exposição simultânea das células Caco-2 à quinidina na presença do derivado xantônico X4 resultou numa diminuição significativa da incorporação do NR para concentrações iguais ou superiores a 100 μM , quando comparando com células incubadas apenas com quinidina (90, 77 e 57 % de incorporação do NR após exposição a 100, 150 e 200 μM de quinidina, respetivamente, na presença de X4, quando comparado com 101, 93 e 85 % observado após exposição apenas a 100, 150 e 200 μM de quinidina, respetivamente). Para a concentração mais baixa de quinidina testada (50 μM) houve uma ausência de diferenças significativas na incorporação do NR para todas as condições em estudo (quinidina + X4; quinidina + X7; quinidina + ZOS), comparativamente com as células incubadas apenas com o substrato da P-gp (quinidina). A exposição simultânea a quinidina e ao derivado X7 resultou numa diminuição significativa da incorporação do NR apenas para a concentração mais alta testada (200 μM). Em concordância, a % de incorporação do NR reduziu para 73% 24 h após exposição a quinidina 200 μM na condição quinidina + X7, quando comparado com 85 % obtida após exposição a quinidina 200 μM na ausência do derivado xantônico. Por último, e como seria de esperar, a exposição simultânea das células Caco-2 a quinidina e ZOS, usado como inibidor potente e específico da P-gp, resultou numa diminuição significativa da incorporação do NR para concentrações de quinidina iguais ou superiores a 100 μM , comprovando o importante papel da P-gp no efluxo deste substrato e, conseqüentemente, na sua citotoxicidade. De fato, a % de

incorporação do NR reduziu para 86, 69 e 36 % 24 h após exposição a quinidina 100, 150 e 250 μM , respectivamente, na condição quinidina + ZOS, quando comparado com 101, 93 e 85 % verificado após exposição a 100, 150 e 200 μM de quinidina, respectivamente, na ausência do inibidor.

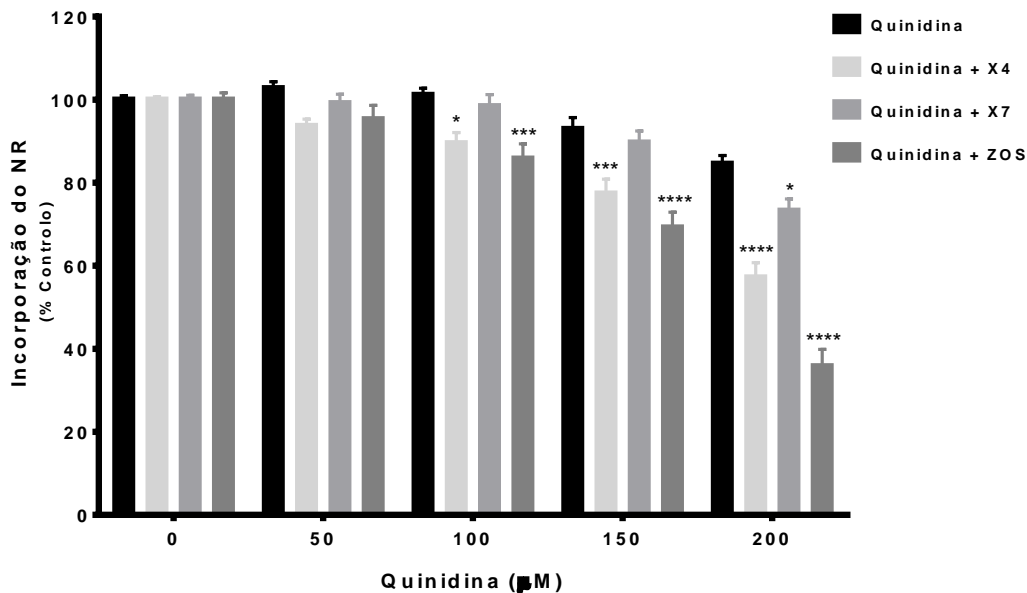


Figura 46. Citotoxicidade da quinidina (0 – 200 μM) avaliada, em células Caco-2, pelo ensaio da incorporação do NR, 24 h após exposição ao substrato da P-gp na presença ou ausência dos derivados X4 e X7 (20 μM) ou do inibidor específico da P-gp, ZOS (5 μM). Os resultados são apresentados como média \pm SD de 4 experiências independentes (realizadas em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas usando o método de Two-way ANOVA, seguido pelo *Sidak's multiple comparisons test* [$*p < 0,05$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$ Quinidina + X4, X7 ou ZOS vs. Quinidina].

Verificou-se que, dos derivados xantônicos em estudo, o composto X4 possui uma maior capacidade de agravamento da citotoxicidade da quinidina, demonstrando que, ao reduzir a expressão e atividade da P-gp 24 h após exposição, parece promover a redução do seu efluxo, aumentando a sua acumulação intracelular e, conseqüentemente, a sua citotoxicidade. Estando descrito, como referido no capítulo anterior, que fármacos anticancerígenos, antidepressivos, antipsicóticos e opioides, entre muitos outros, são substratos da P-gp (Gameiro et al., 2017; Sharom, 2008), e tendo o composto X4 sido descrito no presente estudo como capaz de reduzir a expressão e atividade da P-gp, e com capacidade para agravar a citotoxicidade da DAU e da quinidina, torna-se relevante a realização de mais estudos que avaliem a

capacidade do composto X4 para reverter o fenómeno de MDR, aumentando a acumulação de fármacos que são substratos da P-gp (antidepressivos, analgésicos, antipsicóticos, entre outros) em órgãos/tecidos alvo e, conseqüentemente, aumentando a sua eficácia terapêutica. Um estudo prévio de revisão descreveu que ratos knock-out para a P-gp (KO) administrados com antidepressivos substratos da proteína possuíam uma concentração cerebral de fármacos 2.5x mais elevada que os ratos controlo. Do mesmo modo, ratos KO administrados com risperidona (antipsicótico) demonstraram uma concentração cerebral do composto e do seu metabolito ativo 10x mais elevada do que a observada nos ratos controlo. Deste modo, destaca-se a capacidade da P-gp para modular a permeabilidade dos fármacos no cérebro, nomeadamente de antidepressivos e antipsicóticos (Linnet and Ejsing, 2008). Em concordância, foi descrito por Belli et al. (2010) que indivíduos esquizofrénicos não devidamente medicados com antipsicóticos possuíam um maior risco de cometerem homicídios. Por Boiso Moreno et al. (2013) e Rahikainen et al. (2018) foi descrita a presença de antidepressivos e antipsicóticos em casos de suicídios violentos e suicídios por intoxicação, respetivamente. Do mesmo modo, Bastos and Galante (1976) descreveu a presença de antidepressivos, analgésicos, opioides, entre outros, em casos de mortes traumáticas (Bastos and Galante, 1976; Belli et al., 2010; Boiso Moreno et al., 2013; Rahikainen et al., 2018). Assim, a administração conjunta do fármaco para um determinado objetivo terapêutico e do inibidor da P-gp poderia promover uma maior acumulação do composto nos órgãos/tecidos alvo e, conseqüentemente, aumentar a eficácia terapêutica e reduzir os casos forenses extremos.

V. Conclusão

5. Conclusão

Os resultados obtidos na presente dissertação permitem concluir que:

- A nível da citotoxicidade:
 - Os derivados xantónicos e tioxantónicos estudados não são citotóxicos numa concentração de 20 μ M;
- A nível da capacidade de alterar a atividade e expressão da P-gp:
 - Os compostos X1, Tx1 e Tx10 aumentam significativamente a atividade da P-gp de modo imediato e por contacto direto com esta proteína, sem aumento da expressão da mesma;
 - Os compostos X7, Tx7, Tx8 e Tx9 inibem a atividade da P-gp de modo imediato e por contacto direto com esta proteína;
 - Os compostos X4, X7 e Tx9 reduzem significativamente a atividade da P-gp, 24 h após a exposição aos compostos;
 - Os compostos X4 e Tx1 diminuem significativamente a expressão da P-gp;
- A nível da capacidade de alteração da atividade biológica de substratos da P-gp:
 - Os compostos X4, X7 e Tx7 não agravam a citotoxicidade da DAU quando as células Caco-2 são previamente incubadas com a DAU durante 4 h e só depois expostas aos derivados (tio)xantónicos durante 20 h. O mesmo não se verifica quando as células Caco-2 são pré-expostas aos derivados xantónicos durante 24 h e só posteriormente expostas à DAU, condição na qual os derivados X4 e X7 demonstraram agravar a citotoxicidade da DAU;
 - O derivado xantónico X4 demonstrou maior potência para agravar a citotoxicidade da quinidina, quando comparado com o derivado X7;
- De todos os derivados (tio)xantónicos estudados o composto X4 demonstrou ser um inibidor da atividade e expressão da P-gp, demonstrando a capacidade para influenciar a atividade biológica de

Conclusão

substratos da P-gp, podendo daí resultar consequências clínicas e forenses.

Como reflexão final deste trabalho, sugere-se a realização de mais estudos com o inibidor X4, nomeadamente no sentido de avaliar a sua capacidade de influenciar a atividade terapêutica de antidepressivos, analgésicos, antipsicóticos ou anticancerígenos, compostos relevantes quer a nível clínico como forense.

6. Referências:

- Abuznait AH, Cain C, Ingram D, Burk D and Kaddoumi A (2011) Up-regulation of P-glycoprotein reduces intracellular accumulation of beta amyloid: investigation of P-glycoprotein as a novel therapeutic target for Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol* **63**:1111-1118.
- Ahmed SS, Husain RS, Kumar S and Ramakrishnan V (2016) Association between MDR1 gene polymorphisms and Parkinson's disease in Asian and Caucasian populations: a meta-analysis. *J Neurol Sci* **368**:255-262.
- Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F and Andriulli A (2006) Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World journal of gastroenterology* **12**:3636-3644.
- Anzai N and Endou H Renal drug transporters and nephrotoxicity.
- Assaraf YG, Molina A and Schimke RT (1989a) Cross-resistance to the lipid-soluble antifolate trimetrexate in human carcinoma cells with the multidrug-resistant phenotype. *Journal of the National Cancer Institute* **81**:290-294.
- Assaraf YG, Molina A and Schimke RT (1989b) Sequential amplification of dihydrofolate reductase and multidrug resistance genes in Chinese hamster ovary cells selected for stepwise resistance to the lipid-soluble antifolate trimetrexate. *The Journal of biological chemistry* **264**:18326-18334.
- Ates G, Vanhaecke T, Rogiers V and Rodrigues RM (2017) Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **1601**:19-26.
- Bastami S, Gupta A, Zackrisson AL, Ahlner J, Osman A and Uppugunduri S (2014a) Influence of UGT2B7, OPRM1 and ABCB1 gene polymorphisms on postoperative morphine consumption. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* **115**:423-431.
- Bastami S, Haage P, Kronstrand R, Kugelberg FC, Zackrisson AL and Uppugunduri S (2014b) Pharmacogenetic aspects of tramadol pharmacokinetics and pharmacodynamics after a single oral dose. *Forensic science international* **238**:125-132.
- Bastos ML and Galante L (1976) Toxicological findings in victims of traumatic deaths. *Journal of forensic sciences* **21**:176-186.
- Belli H, Ozcetin A, Ertem U, Tuyluoglu E, Namli M, Bayik Y and Simsek D (2010) Perpetrators of homicide with schizophrenia: sociodemographic characteristics and clinical factors in the eastern region of Turkey. *Compr Psychiatry* **51**:135-141.
- Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, Kreyling W, de la Fuente JM, Grazu V, Borm P, Estrada G, Ntziachristos V and Razansky D (2010) Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Part Fibre Toxicol* **7**:3.
- Boiso Moreno S, Zackrisson AL, Jakobsen Falk I, Karlsson L, Carlsson B, Tillmar A, Kugelberg FC, Ahlner J, Hagg S and Green H (2013) ABCB1 gene polymorphisms are associated with suicide in forensic autopsies. *Pharmacogenetics and genomics* **23**:463-469.
- Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, Stoter G and Nooter K (2003) RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**:827-836.
- Callaghan R, Crowley E, Potter S and Kerr ID (2008) P-glycoprotein: so many ways to turn it on. **48**:365-378.

Referências

- Campa D, Gioia A, Tomei A, Poli P and Barale R (2008) Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief. *Clinical pharmacology and therapeutics* **83**:559-566.
- Cascorbi I, Gerloff T, Johné A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U and Roots I (2001) Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clinical pharmacology and therapeutics* **69**:169-174.
- Chae SW, Woo S, Park JH, Kwon Y, Na Y and Lee HJ (2015) Xanthone analogues as potent modulators of intestinal P-glycoprotein. *Eur J Med Chem* **93**:237-245.
- Chan HS, Grogan TM, Haddad G, DeBoer G and Ling V (1997) P-glycoprotein expression: critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute* **89**:1706-1715.
- Colabufo NA, Berardi F, Contino M, Niso M and Perrone R (2009) ABC pumps and their role in active drug transport. *Current topics in medicinal chemistry* **9**:119-129.
- Deeley RG and Cole SP (2006) Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS letters* **580**:1103-1111.
- DeGorter MK, Xia CQ, Yang JJ and Kim RB (2012) Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **52**:249-273.
- Demeule M, Jodoin J, Beaulieu E, Brossard M and Beliveau R (1999) Dexamethasone modulation of multidrug transporters in normal tissues. *FEBS letters* **442**:208-214.
- Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Remiao F, Sanchez-Navarro A, Bastos ML and Carvalho F (2006) Single high dose dexamethasone treatment decreases the pathological score and increases the survival rate of paraquat-intoxicated rats. *Toxicology* **227**:73-85.
- Doherty MM and Charman WN (2002) The mucosa of the small intestine: how clinically relevant as an organ of drug metabolism? *Clinical pharmacokinetics* **41**:235-253.
- Doring B and Petzinger E (2014) Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug metabolism reviews* **46**:261-282.
- Dorr R, Karanes C, Spier C, Grogan T, Greer J, Moore J, Weinberger B, Schiller G, Pearce T, Litchman M, Dalton W, Roe D and List AF (2001) Phase I/II study of the P-glycoprotein modulator PSC 833 in patients with acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **19**:1589-1599.
- Drori S, Eytan GD and Assaraf YG (1995) Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by multidrug-resistance chemosensitizers involves alterations in membrane fluidity leading to increased membrane permeability. *European journal of biochemistry* **228**:1020-1029.
- EIAlí A and Hermann DM (2011) ATP-binding cassette transporters and their roles in protecting the brain. *Neuroscientist* **17**:423-436.
- Estudante M, Morais JG, Soveral G and Benet LZ (2013) Intestinal drug transporters: An overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**:1340-1356.
- Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W and Schrenk D (2000) The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters. *The American journal of pathology* **157**:1575-1580.
- Fujii T, Ota M, Hori H, Sasayama D, Hattori K, Teraishi T, Yamamoto N, Hashikura M, Tatsumi M, Higuchi T and Kunugi H (2012) Association between the functional polymorphism (C3435T) of the gene encoding P-glycoprotein (ABCB1) and major depressive disorder in the Japanese population. *J Psychiatr Res* **46**:555-559.

- Gameiro M, Silva R, Rocha-Pereira C, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML and Remiao F (2017) Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. *Molecules* **22**.
- Ghibellini G, Leslie EM and Brouwer KL (2006) Methods to evaluate biliary excretion of drugs in humans: an updated review. *Molecular pharmaceutics* **3**:198-211.
- Girardin F (2006) Membrane transporter proteins: a challenge for CNS drug development. *Dialogues Clin Neurosci* **8**:311-321.
- Hagenbuch B (2010) Drug uptake systems in liver and kidney: a historic perspective. *Clinical pharmacology and therapeutics* **87**:39-47.
- Harfenist M, Joseph DM, Spence SC, McGee DP, Reeves MD and White HL (1997) Selective inhibitors of monoamine oxidase. 4. SAR of tricyclic N-methylcarboxamides and congeners binding at the tricyclics' hydrophilic binding site. *J Med Chem* **40**:2466-2473.
- Hawkins BT and Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **57**:173-185.
- Higgins CF (2007) Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **446**:749-757.
- Higgins CF and Linton KJ (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology* **11**:918-926.
- Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE and Altman RB (2011) Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenetics and genomics* **21**:152-161.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M and Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:3473-3478.
- Hori R, Okamura N, Aiba T and Tanigawara Y (1993) Role of P-glycoprotein in renal tubular secretion of digoxin in the isolated perfused rat kidney. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **266**:1620-1625.
- Inui KI, Masuda S and Saito H (2000) Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int* **58**:944-958.
- Jonker JW, Stedman CA, Liddle C and Downes M (2009) Hepatobiliary ABC transporters: physiology, regulation and implications for disease. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **14**:4904-4920.
- Juliano RL and Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta* **455**:152-162.
- Karlsson L, Green H, Zackrisson AL, Bengtsson F, Jakobsen Falk I, Carlsson B, Ahlner J and Kugelberg FC (2013) ABCB1 gene polymorphisms are associated with fatal intoxications involving venlafaxine but not citalopram. *International journal of legal medicine* **127**:579-586.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG and Wilkinson GR (2001) Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clinical pharmacology and therapeutics* **70**:189-199.
- Kipp H and Arias IM (2000) Intracellular trafficking and regulation of canalicular ATP-binding cassette transporters. *Seminars in liver disease* **20**:339-351.
- Kis E, Iojă E, Nagy T, Szente L, Heredi-Szabo K and Krajcsi P (2009) Effect of membrane cholesterol on BSEP/Bsep activity: species specificity studies for substrates and inhibitors. *Drug Metab Dispos* **37**:1878-1886.

Referências

- Kobori T, Harada S, Nakamoto K and Tokuyama S (2014) Mechanisms of P-glycoprotein alteration during anticancer treatment: role in the pharmacokinetic and pharmacological effects of various substrate drugs. *Journal of pharmacological sciences* **125**:242-254.
- Kock K and Brouwer KL (2012) A perspective on efflux transport proteins in the liver. *Clinical pharmacology and therapeutics* **92**:599-612.
- Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JC, Vaalburg W, Bart J, Willemsen AT and Hendrikse NH (2005) Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol* **57**:176-179.
- Lee W and Kim RB (2004) Transporters and renal drug elimination. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**:137-166.
- Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M and Johnson MR (2007) ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J* **7**:154-179.
- Leslie EM, Deeley RG and Cole SP (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**:216-237.
- Linnet K and Ejsing TB (2008) A review on the impact of P-glycoprotein on the penetration of drugs into the brain. Focus on psychotropic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol* **18**:157-169.
- Linton KJ (2007) Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda, Md)* **22**:122-130.
- Linton KJ and Higgins CF (2007) Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch* **453**:555-567.
- Loo TW and Clarke DM (2014) Tariquidar inhibits P-glycoprotein drug efflux but activates ATPase activity by blocking transition to an open conformation. *Biochem Pharmacol* **92**:558-566.
- Lopes A, Martins E, Silva R, Pinto MMM, Remiao F, Sousa E and Fernandes C (2018) Chiral Thioxanthenes as Modulators of P-glycoprotein: Synthesis and Enantioselectivity Studies. *Molecules* **23**.
- Lory PMJ, Estrella-Jimenez ME, Shashack MJ, Lokesh GL, Natarajan A and Gilbertson SR (2007) Synthesis and screening of 3-substituted thioxanthen-9-one-10,10-dioxides. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **17**:5940-5943.
- Loscher W and Potschka H (2005) Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2**:86-98.
- Martins E, Silva V, Lemos A, Palmeira A, Puthongking P, Sousa E, Rocha-Pereira C, Ghanem CI, Carmo H, Remiao F and Silva R (2019) Newly Synthesized Oxygenated Xanthenes as Potential P-Glycoprotein Activators: In Vitro, Ex Vivo, and In Silico Studies. *Molecules* **24**.
- Masters KS and Brase S (2012) Xanthenes from fungi, lichens, and bacteria: the natural products and their synthesis. *Chem Rev* **112**:3717-3776.
- Morrissey KM, Stocker SL, Wittwer MB, Xu L and Giacomini KM (2013) Renal transporters in drug development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**:503-529.
- Mottino AD and Catania VA (2008) Hepatic drug transporters and nuclear receptors: regulation by therapeutic agents. *World J Gastroenterol* **14**:7068-7074.
- O'Brien FE, O'Connor RM, Clarke G, Dinan TG, Griffin BT and Cryan JF (2013) P-glycoprotein inhibition increases the brain distribution and antidepressant-like activity of

- escitalopram in rodents. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **38**:2209-2219.
- Oostendorp RL, Beijnen JH and Schellens JH (2009) The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier. *Cancer treatment reviews* **35**:137-147.
- Opara J, Malecki A, Malecka E and Socha T (2017) Motor assessment in Parkinson's disease. *Ann Agric Environ Med* **24**:411-415.
- Paiva AM, Pinto MM and Sousa E (2013) A century of thioxanthenes: through synthesis and biological applications. *Current medicinal chemistry* **20**:2438-2457.
- Palmeira A, Sousa E, Vasconcelos MH and Pinto MM (2012a) Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Current medicinal chemistry* **19**:1946-2025.
- Palmeira A, Vasconcelos MH, Paiva A, Fernandes MX, Pinto M and Sousa E (2012b) Dual inhibitors of P-glycoprotein and tumor cell growth: (re)discovering thioxanthenes. *Biochem Pharmacol* **83**:57-68.
- Pang KS (2003) Modeling of intestinal drug absorption: roles of transporters and metabolic enzymes (for the Gillette Review Series). *Drug Metab Dispos* **31**:1507-1519.
- Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA and Kortsaris AH (1997) Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of immunological methods* **208**:151-158.
- Perri T, Fogel M, Mor S, Horev G, Meller I, Loven D, Issakov J, Kollender Y, Smirnov A, Zaizov R and Cohen IJ (2001) Effect of P-glycoprotein expression on outcome in the Ewing family of tumors. *Pediatric hematology and oncology* **18**:325-334.
- Pinto M (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol cell* **47**:323-330.
- Pinto MM, Sousa ME and Nascimento MS (2005) Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Current medicinal chemistry* **12**:2517-2538.
- Prachayasittikul V and Prachayasittikul V (2016) P-glycoprotein transporter in drug development. *EXCLI J* **15**:113-118.
- Rahikainen AL, Palo JU, Haukka J and Sajantila A (2018) Post-mortem analysis of suicide victims shows ABCB1 haplotype 1236T-2677T-3435T as a candidate predisposing factor behind adverse drug reactions in females. *Pharmacogenetics and genomics* **28**:99-106.
- Rashid Z and Basson MD (1996) Topoisomerase II inhibition differentially modulates Caco-2 intestinal epithelial cell phenotype. *Biochemical and biophysical research communications* **219**:82-88.
- Riordan JR, Deuchars K, Kartner N, Alon N, Trent J and Ling V (1985) Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* **316**:817-819.
- Rives ML, Javitch JA and Wickenden AD (2017) Potentiating SLC transporter activity: Emerging drug discovery opportunities. *Biochem Pharmacol* **135**:1-11.
- Rodriguez-Corrales JA and Josan JS (2017) Resazurin Live Cell Assay: Setup and Fine-Tuning for Reliable Cytotoxicity Results. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **1647**:207-219.
- Russel FG, Masereeuw R and van Aubel RA (2002) Molecular aspects of renal anionic drug transport. *Annu Rev Physiol* **64**:563-594.
- Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A and Zucco F (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell biology and toxicology* **21**:1-26.
- Schinkel AH and Jonker JW (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* **55**:3-29.
- Shadnia S, Soltaninejad K, Heydari K, Sasanian G and Abdollahi M (2008) Tramadol intoxication: a review of 114 cases. *Human & experimental toxicology* **27**:201-205.

Referências

- Shan T, Ma Q, Guo K, Liu J, Li W, Wang F and Wu E (2011) Xanthones from mangosteen extracts as natural chemopreventive agents: potential anticancer drugs. *Current molecular medicine* **11**:666-677.
- Shapiro AB and Ling V (1997) Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* **53**:587-596.
- Sharom FJ (2008) ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* **9**:105-127.
- Silva R, Carmo H, Dinis-Oliveira R, Cordeiro-da-Silva A, Lima SC, Carvalho F, Bastos Mde L and Remiao F (2011) In vitro study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells. *Arch Toxicol* **85**:315-326.
- Silva R, Carmo H, Vilas-Boas V, Barbosa DJ, Palmeira A, Sousa E, Carvalho F, Bastos Mde L and Remiao F (2014a) Colchicine effect on P-glycoprotein expression and activity: in silico and in vitro studies. *Chem Biol Interact* **218**:50-62.
- Silva R, Palmeira A, Carmo H, Barbosa DJ, Gameiro M, Gomes A, Paiva AM, Sousa E, Pinto M, Bastos Mde L and Remiao F (2015a) P-glycoprotein induction in Caco-2 cells by newly synthesized thioxanthenes prevents paraquat cytotoxicity. *Arch Toxicol* **89**:1783-1800.
- Silva R, Sousa E, Carmo H, Palmeira A, Barbosa DJ, Gameiro M, Pinto M, Bastos Mde L and Remiao F (2014b) Induction and activation of P-glycoprotein by dihydroxylated xanthenes protect against the cytotoxicity of the P-glycoprotein substrate paraquat. *Arch Toxicol* **88**:937-951.
- Silva R, Vilas-Boas V, Carmo H, Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, de Lourdes Bastos M and Remiao F (2015b) Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* **149**:1-123.
- Sun H, Dai H, Shaik N and Elmquist WF (2003) Drug efflux transporters in the CNS. *Adv Drug Deliv Rev* **55**:83-105.
- Sun J, He ZG, Cheng G, Wang SJ, Hao XH and Zou MJ (2004) Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **10**:Ra5-14.
- Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C and Gottesman MM (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**:219-234.
- Szakacs G, Varadi A, Ozvegy-Laczka C and Sarkadi B (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* **13**:379-393.
- Tada Y, Wada M, Migita T, Nagayama J, Hinoshita E, Mochida Y, Maehara Y, Tsuneyoshi M, Kuwano M and Naito S (2002) Increased expression of multidrug resistance-associated proteins in bladder cancer during clinical course and drug resistance to doxorubicin. *International journal of cancer* **98**:630-635.
- Taipalensuu J, Tornblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjoqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjostrom B, Lundgren B and Artursson P (2001) Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **299**:164-170.
- Tchamo DN, Dijoux-Franca MG, Mariotte AM, Tsamo E, Daskiewicz JB, Bayet C, Barron D, Conseil G and Di Pietro A (2000) Prenylated xanthenes as potential P-glycoprotein modulators. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **10**:1343-1345.
- Torres-Vergara P and Penny J (2018) Pro-inflammatory and anti-inflammatory compounds exert similar effects on P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells. *J Pharm Pharmacol* **70**:713-722.

- van der Zee AG, Hollema H, Suurmeijer AJ, Krans M, Sluiter WJ, Willemse PH, Aalders JG and de Vries EG (1995) Value of P-glycoprotein, glutathione S-transferase pi, c-erbB-2, and p53 as prognostic factors in ovarian carcinomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **13**:70-78.
- van Ginneken CA and Russel FG (1989) Saturable pharmacokinetics in the renal excretion of drugs. *Clinical pharmacokinetics* **16**:38-54.
- van Montfoort JE, Hagenbuch B, Groothuis GM, Koepsell H, Meier PJ and Meijer DK (2003) Drug uptake systems in liver and kidney. *Current drug metabolism* **4**:185-211.
- van Tonder A, Joubert AM and Cromarty AD (2015) Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes* **8**:47.
- Varma MV, Ambler CM, Ullah M, Rotter CJ, Sun H, Litchfield J, Fenner KS and El-Kattan AF (2010) Targeting intestinal transporters for optimizing oral drug absorption. *Current drug metabolism* **11**:730-742.
- Varma MV, Ashokraj Y, Dey CS and Panchagnula R (2003) P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacological research* **48**:347-359.
- Vilas-Boas V, Silva R, Gaio AR, Martins AM, Lima SC, Cordeiro-da-Silva A, de Lourdes Bastos M and Remiao F (2011) P-glycoprotein activity in human Caucasian male lymphocytes does not follow its increased expression during aging. *Cytometry A* **79**:912-919.
- Vilas-Boas V, Silva R, Nunes C, Reis S, Ferreira L, Vieira C, Carvalho F, Bastos Mde L and Remiao F (2013a) Mechanisms of P-gp inhibition and effects on membrane fluidity of a new rifampicin derivative, 1,8-dibenzoyl-rifampicin. *Toxicol Lett* **220**:259-266.
- Vilas-Boas V, Silva R, Palmeira A, Sousa E, Ferreira LM, Branco PS, Carvalho F, Bastos Mde L and Remiao F (2013b) Development of novel rifampicin-derived P-glycoprotein activators/inducers. synthesis, in silico analysis and application in the RBE4 cell model, using paraquat as substrate. *PLoS One* **8**:e74425.
- Vogelgesang S, Cascorbi I, Schroeder E, Pahnke J, Kroemer HK, Siegmund W, Kunert-Keil C, Walker LC and Warzok RW (2002) Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics* **12**:535-541.
- Wang B, Ngoi S, Wang J, Chong SS and Lee CG (2006) The promoter region of the MDR1 gene is largely invariant, but different single nucleotide polymorphism haplotypes affect MDR1 promoter activity differently in different cell lines. *Molecular pharmacology* **70**:267-276.
- Westerlund M, Belin AC, Olson L and Galter D (2008) Expression of multi-drug resistance 1 mRNA in human and rodent tissues: reduced levels in Parkinson patients. *Cell Tissue Res* **334**:179-185.
- Wong M, Evans S, Rivory LP, Hoskins JM, Mann GJ, Farlow D, Clarke CL, Balleine RL and Gurney H (2005) Hepatic technetium Tc 99m-labeled sestamibi elimination rate and ABCB1 (MDR1) genotype as indicators of ABCB1 (P-glycoprotein) activity in patients with cancer. *Clinical pharmacology and therapeutics* **77**:33-42.
- Yamauchi A, Ieiri I, Kataoka Y, Tanabe M, Nishizaki T, Oishi R, Higuchi S, Otsubo K and Sugimachi K (2002) Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation* **74**:571-572.
- Yoshida K, Maeda K and Sugiyama Y (2013) Hepatic and intestinal drug transporters: prediction of pharmacokinetic effects caused by drug-drug interactions and genetic polymorphisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**:581-612.

Referências

- Zhang Y, Wang C, Liu Z, Meng Q, Huo X, Liu Q, Sun P, Yang X, Sun H, Ma X and Liu K (2018) P-gp is involved in the intestinal absorption and biliary excretion of afatinib in vitro and in rats. *Pharmacol Rep* **70**:243-250.
- Zhou SF (2008) Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **38**:802-832.
- Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG and Li Y (2008) Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Current medicinal chemistry* **15**:1981-2039.
- Zlokovic BV (2005) Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends in neurosciences* **28**:202-208.