



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

COVILHÃ | PORTUGAL

**DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DA RODAMINA 123 EM
PLASMA DE RATO: FERRAMENTA PARA A AVALIAÇÃO
IN VIVO DA ACTIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P**

Ana Isabel Figueiredo Martins

COVILHÃ, 2010



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

COVILHÃ | PORTUGAL

**DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DA RODAMINA 123 EM
PLASMA DE RATO: FERRAMENTA PARA A AVALIAÇÃO
IN VIVO DA ACTIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P**

Ana Isabel Figueiredo Martins

COVILHÃ, 2010

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE MESTRE
EM BIOQUÍMICA APRESENTADA À UNIVERSIDADE DA
BEIRA INTERIOR

Trabalho realizado no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) da Universidade da Beira Interior em colaboração com o Grupo de Farmacométrie do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNBC) da Universidade de Coimbra, orientado pelo Professor Doutor Gilberto Alves e co-orientado pelo Professor Doutor Amílcar Falcão.

“Jamais consideres os teus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para o teu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual o teu futuro trabalho pertencer.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação, não seria possível sem o apoio directo ou indirecto de várias pessoas. A elas, presto os meus mais sinceros agradecimentos:

Ao Professor Doutor Gilberto Alves agradeço pela orientação científica, disponibilidade, profissionalismo e humanismo, transmitindo-me conhecimentos essenciais, apoiando-me e encorajando-me a continuar. Obrigado pela sua amizade.

Ao Professor Doutor Amílcar Falcão, co-orientador desta dissertação, agradeço pela disponibilidade e ajuda que prestou, mesmo à distância, especialmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais e avós, pelo amor, carinho, afecto, dedicação e amizade. Obrigado por terem feito de mim a pessoa que hoje sou e estarem sempre presentes na minha vida. O esforço por vós realizado, transmitiu-me força e alento, ajudando a não me desviar do caminho desde cedo traçado. Obrigado por acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, pelo companheirismo, compreensão, carinho, força e paciência. Ao meu afilhado, a quem nem sempre pude dar a devida atenção, mas que sempre trago no meu coração e pensamento. A esperança de fazer dele um homem do amanhã, contribuindo em tudo o que estiver ao meu alcance é, sem dúvida, uma das principais razões que nunca me levaram a desistir.

À Susana e família, por me terem apoiado nos momentos mais difíceis desta minha etapa de estudante, pela amizade e confiança depositada. Obrigado por fazerem parte da minha vida. Jamais vos esquecerei.

Aos meus colegas de laboratório, pelo bom ambiente proporcionado ao longo de todo este tempo e espírito de entreajuda. Ao meu colega Márcio, um obrigado em especial, por toda ajuda e tempo disponibilizado. A todos eles, desejo as maiores felicidades tanto a nível profissional como pessoal.

ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	III
LISTA DE ABREVIATURAS	V
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A descoberta da glicoproteína-P	3
1.2. Estrutura da glicoproteína-P	6
1.3. Mecanismo de efluxo mediado pela glicoproteína-P	7
1.4. Distribuição tecidual e função fisiológica da glicoproteína-P	9
1.5. Expressão da glicoproteína-P nas células tumorais	10
1.6. A glicoproteína-P e as suas implicações farmacocinéticas	13
1.7. A inibição da glicoproteína-P	15
1.7.1. Inibidores da glicoproteína-P de primeira geração	15
1.7.2. Inibidores da glicoproteína-P de segunda geração	17
1.7.3. Inibidores da glicoproteína-P de terceira geração	18
1.7.4. Inibição da glicoproteína-P por extractos ou constituintes de plantas	19
1.7.4.1. <i>Rosmarinus officinalis</i>	20
1.7.4.2. <i>Curcuma longa</i>	21
1.7.4.3. <i>Panax ginseng</i>	22
1.7.4.4. <i>Camellia sinensis</i>	22
1.7.4.5. Produtos e fitoquímicos de espécies do género <i>Citrus</i>	23
1.7.4.5.1. Sumo de toranja	23
1.7.4.5.2. Sumo de laranja	24
1.7.4.5.3. Outros constituintes fitoquímicos do género <i>Citrus</i>	25
1.7.4.6. Outras espécies de plantas	26
1.8. Modelos para identificar inibidores da glicoproteína-P candidatos a fármacos	28
2. OBJECTIVOS DA DISSERTAÇÃO	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Padrão de rodamina 123	33
3.2. Matriz biológica	34

3.3. Solução <i>stock</i> , padrões de calibração e amostras de controlo de qualidade ...	34
3.4. Preparação das amostras	35
3.5. Espectrofluorímetro e condições de detecção seleccionadas	35
3.6. Validação do método	36
3.6.1. Selectividade	36
3.6.2. Curva de calibração e limite de quantificação	37
3.6.3. Precisão e exactidão	38
3.6.4. Recuperação	40
3.6.5. Estabilidade na matriz biológica	40
3.6.6. Aplicação do método e farmacocinética da rodamina 123	41
4. RESULTADOS	45
4.1. Validação do método fluorimétrico para determinação da rodamina 123	45
4.1.1. Selectividade	45
4.1.2. Curva de calibração e limite de quantificação	46
4.1.3. Precisão e exactidão	47
4.1.4. Recuperação	48
4.1.5. Estabilidade da rodamina 123 na matriz biológica	48
4.2. Aplicação do método e farmacocinética da rodamina 123 no rato	49
4.2.1. Perfil plasmático da rodamina 123 na ausência de verapamil	49
4.2.2. Perfil plasmático da rodamina 123 na presença de verapamil	51
4.2.3. Análise farmacocinética dos perfis plasmáticos de rodamina 123	53
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sumário cronológico dos principais marcos da investigação relacionada com a glicoproteína-P	5
Figura 2. Estrutura da glicoproteína-P	7
Figura 3. Modelos propostos para explicar o mecanismo de efluxo mediado pela glicoproteína-P: a) <i>modelo poroso</i> , b) <i>modelo flipase</i> e c) <i>modelo do aspirador a vácuo hidrofóbico (hydrofobic vacuum cleaner)</i>	8
Figura 4. Representação esquemática dos principais tecidos de expressão e localização da glicoproteína-P	11
Figura 5. Inibidores da glicoproteína-P de primeira geração	16
Figura 6. Estrutura química da rodamina 123 [éster metílico do ácido 2-(6-amino-3-imino-3H-xanteno-9-il) benzóico; fórmula molecular: $C_{21}H_{17}ClN_2O_3$; peso molecular: 380,83]	33
Figura 7. Perfis plasmáticos concentração-tempo obtidos para a rodamina 123 em ratos Wistar, pré-tratados com carboximetilcelulose, após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de rodamina 123. Os símbolos representam a média \pm desvio padrão de 5 determinações por ponto do tempo (n = 5)	50
Figura 8. Perfis plasmáticos concentração-tempo obtidos para a rodamina 123 em ratos Wistar, pré-tratados com verapamil em carboximetilcelulose, após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de rodamina 123. Os símbolos representam a média \pm desvio padrão de 5 determinações por ponto do tempo (n = 5) ..	52
Figura 9. Perfis plasmáticos médios concentração-tempo de rodamina 123 obtidos em ratos Wistar após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de rodamina 123, na ausência e na presença de pré-tratamento com verapamil. Os símbolos representam a média de 5 determinações por ponto do tempo (n = 5)	54
Figura 10. Razão para os parâmetros farmacocinéticos $C_{\text{max}(C_0)}$, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$ estimados a partir dos perfis plasmáticos médios obtidos para a rodamina 123 após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a ratos Wistar pré-tratados ou não com verapamil	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Outras espécies de plantas cujos extractos mostraram inibir a actividade da glicoproteína-P (gp-P) em diferentes modelos experimentais que expressam naturalmente ou são induzidos a expressar a gp-P	27
Tabela 2. Variabilidade da intensidade de fluorescência (CV %) e interferência (<i>bias</i> %) de substâncias (endógenas à matriz de plasma de rato e exógenas) na intensidade de fluorescência da rodamina 123 na concentração correspondente ao limite de quantificação (0,04 µg/mL) (n = 6)	46
Tabela 3. Curvas de calibração para a rodamina 123 em plasma de rato (n = 6)	46
Tabela 4. Precisão (CV %) e exactidão (<i>bias</i> %) para a determinação da rodamina 123 em plasma de rato na concentração correspondente ao limite de quantificação (n = 6)	47
Tabela 5. Precisão (CV %) e exactidão (<i>bias</i> %) na determinação da rodamina 123 em plasma de rato nas concentrações de 0,1 µg/mL (CQ ₁), 1,8 µg/mL (CQ ₂) e 3,6 µg/mL (CQ ₃) (n = 6)	47
Tabela 6. Recuperação (%) da rodamina 123 a partir de plasma de rato nas concentrações de 0,1 µg/mL (CQ ₁), 1,8 µg/mL (CQ ₂) e 3,6 µg/mL (CQ ₃) (n = 6)	48
Tabela 7. Estabilidade (valores em %) da rodamina 123 em plasma de rato nas concentrações de 0,1 µg/mL (CQ ₁) e 3,6 µg/mL (CQ ₃) (n = 6)	49
Tabela 8. Concentrações plasmáticas de rodamina 123 após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 µg/kg a ratos Wistar pré-tratados com carboximetilcelulose (n = 5)	50
Tabela 9. Concentrações plasmáticas de rodamina 123 após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 µg/kg a ratos Wistar pré-tratados com verapamil em carboximetilcelulose (n = 5)	52
Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos plasmáticos para a rodamina 123 estimados mediante análise farmacocinética não-compartmental dos perfis plasmáticos médios concentração-tempo obtidos em ratos Wistar após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 µg/kg de rodamina 123, na ausência e na presença de pré-tratamento com verapamil	54

RESUMO

A resistência a múltiplos fármacos (*multidrug resistance*, MDR) constitui um dos maiores obstáculos no tratamento do cancro. Acredita-se que um dos principais mecanismos envolvidos na MDR seja a sobreexpressão, em células cancerígenas, de um transportador membranar de efluxo de fármacos dependente de ATP, a glicoproteína-P (gp-P). A gp-P desempenha um papel significativo na absorção e disposição de muitos fármacos, incluindo anticancerígenos. Em particular, a sobreexpressão da gp-P em células cancerígenas confere resistência ao impedir a acumulação intracelular de fármacos. O objectivo deste estudo foi desenvolver e validar um método fluorimétrico rápido e sensível, em plasma de rato, para apoiar a identificação *in vivo* de inibidores da gp-P, usando a rodamina 123 como uma sonda fluorescente da actividade da gp-P.

A preparação das amostras consistiu apenas na desproteinização do plasma com acetonitrilo. A cada alíquota (200 µL) de plasma, foi adicionado um volume igual de acetonitrilo. A mistura foi agitada no vortex (10 s) e centrifugada a 17000 rpm durante 20 min (4° C). De seguida, 200 µL de sobrenadante foram transferidos para os poços de uma microplaca de 96 poços. As concentrações de rodamina 123 foram determinadas por fluorimetria, utilizando comprimentos de onda de excitação/emissão de 480/575 nm, respectivamente.

As curvas de calibração obtidas para a intensidade de fluorescência *versus* concentração de rodamina 123 mostraram linearidade ($r^2 \geq 0.998$) de 0,04-4 µg/mL. O limite de quantificação (LOQ) do método foi de 0,04 µg/mL. O método demonstrou ser preciso e exacto. A imprecisão global não excedeu 15% (ou 20% no LOQ) e a inexactidão variou dentro de ±15% (ou ±20% no LOQ). A rodamina 123 foi extraída a partir das amostras de plasma com uma recuperação média global de aproximadamente 90%. O método foi aplicado à determinação da rodamina 123 em amostras reais de plasma de ratos pré-tratados ou não com verapamil, aos quais foi administrada uma dose única de rodamina 123 (500 µg/kg, i.v.).

Este método parece ser uma ferramenta útil para seguir a farmacocinética da rodamina 123 em plasma de rato, podendo apoiar programas de *screening* para a descoberta de inibidores da gp-P candidatos a fármacos.

Palavras-chave: fluorimetria, rodamina 123, plasma de rato, glicoproteína-P

ABSTRACT

Multidrug resistance (MDR) is a major obstacle in cancer treatment. One of the most important mechanisms implicated in MDR is believed to be the over-expression of the ATP-dependent drug efflux transmembrane transporter, P-glycoprotein (P-gp), in cancer cells. P-gp plays a significant role in the absorption and disposition of many drugs, including anticancer agents. In particular, the over-expression of P-gp in cancer cells confers resistance by preventing the sufficient intracellular drug accumulation. The aim of this study was to develop and validate a rapid and sensitive fluorimetry-based assay in rat plasma to support the *in vivo* identification of P-gp inhibitors, using rhodamine 123 as a fluorescent probe of the P-gp activity.

Sample preparation consisted of a single-step precipitation of rat plasma proteins with acetonitrile. Each aliquot (200 μ L) of plasma was added with an equal volume of acetonitrile. The mixture was vortex-mixed for 10 s and centrifuged at 17000 rpm for 20 min (4 $^{\circ}$ C). Then, 200 μ L of the supernatant were transferred to the wells of a 96-well microplate. Rhodamine 123 concentrations were measured by fluorimetric detection using the excitation/emission wavelengths of 480/575 nm, respectively.

The calibration curves prepared by plotting fluorescence intensity *versus* rhodamine 123 concentrations were linear ($r^2 \geq 0.998$) in the range of 0.04-4 μ g/mL. The limit of quantification (LOQ) of the assay was established at 0.04 μ g/mL. The assay was found to be precise and accurate. The overall imprecision did not exceed 15% (or 20% in the LOQ) and the inaccuracy was within $\pm 15\%$ (or $\pm 20\%$ in the LOQ). Rhodamine 123 was extracted from rat plasma samples with an overall mean recovery of approximately 90%. The assay was successfully applied to the determination of rhodamine 123 in real plasma samples collected from rats, *pré*-treated or not with verapamil, which received a single-dose of rhodamine 123 (500 μ g/kg, *i.v.*).

This assay seems to be a useful tool to follow the pharmacokinetics of rhodamine 123 in rat plasma, may support screening programs for discovery of drug candidates as P-gp inhibitors.

Keywords: fluorimetry assay, rhodamine 123, rat plasma, P-glycoprotein

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC, *ATP-binding cassette*

ADP, difosfato de adenosina

ATP, trifosfato de adenosina

AUC, área sobre a curva concentração-tempo (*area under the curve*)

AUC_{0-t}, área sob a curva concentração-tempo desde o tempo zero até t

AUC_{0-∞}, área sob a curva concentração-tempo desde o tempo zero até infinito

BCRP, proteína de resistência ao cancro da mama (*breast cancer resistance protein*)

CQ, controlo de qualidade

CV, coeficiente de variação

CYP 3A4, isoenzima 3A4 do citocromo P450

gp-P, glicoproteína-P

HPLC, cromatografia líquida de elevada resolução

HPLC-UV, cromatografia líquida de elevada resolução com detecção no ultravioleta

HVC, aspirador a vácuo hidrofóbico (*hydrofobic vacuum cleaner*)

MDR, resistência a múltiplos fármacos (*multidrug resistance*)

MRPs, proteínas de resistência a múltiplos fármacos (*multidrug resistance proteins*)

NBDs, domínios de ligação de nucleótidos

r², coeficiente de regressão

rpm, rotações por minuto

UV, ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

A resistência a múltiplos fármacos (*multidrug resistance*, MDR), intrínseca ou adquirida, é um dos principais obstáculos ao sucesso da farmacoterapia. O fenótipo da MDR tem sido encontrado frequentemente na sequência do tratamento farmacológico de vários tipos de cancro, artrite reumatóide e epilepsia. Porém, os mecanismos celulares subjacentes não estão inteiramente elucidados (TAKARA *et al.*, 2006). Reconhece-se, no entanto, que a MDR seja um fenómeno multifactorial, mediado, provavelmente, por múltiplos mecanismos, particularmente pela presença na membrana plasmática celular de proteínas de efluxo pertencentes à superfamília de transportadores membranares *ATP-binding cassette* (ABC). Estas proteínas membranares partilham propriedades estruturais e funcionais comuns, requerendo energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) para mediar a extrusão activa transmembranar de substâncias, incluindo fármacos (DI PIETRO *et al.*, 2002; SHTIL, 2002; SHUKLA *et al.*, 2008). Assim, embora sejam várias as proteínas transportadoras da superfamília ABC capazes de contribuir para o fenótipo de MDR, a glicoproteína-P (gp-P), também designada de MDR1 e ABCB1, é talvez o transportador de efluxo melhor caracterizado e, presumivelmente, aquele que mais contribui para a MDR no homem (TAKARA *et al.*, 2006).

A resistência intrínseca ou adquirida aos fármacos anticancerígenos continua a apresentar-se como um dos principais factores que têm impedido o progresso da quimioterapia, pois tem-se observado, muitas vezes, resistência simultânea a diversos fármacos anticancerígenos, mesmo que não tenham sido antes usados em quimioterapia. Um número crescente de estudos clínicos tem correlacionado a sobreexpressão da gp-P com a resistência farmacológica de vários tipos de cancro. De facto, a gp-P, através de mecanismos de transporte activo de efluxo, pode contribuir significativamente para mediar a resistência das células tumorais à quimioterapia, impedindo a acumulação intracelular dos fármacos anticancerígenos em concentrações suficientes para promover a morte celular (MODOK *et al.*, 2006; TAKARA *et al.*, 2006).

É de salientar também que, a gp-P para além de ser expressada pelas células tumorais, é também largamente expressada por células sãs do organismo, particularmente pelas células da mucosa intestinal, dos canalículos biliares do fígado,

dos túbulos proximais do rim e pelas células endoteliais da barreira hematoencefálica. Desta forma, a gp-P interfere com a disposição de inúmeros fármacos que são substratos desta proteína, limitando a sua biodisponibilidade ao promover a sua eliminação activa, minimizando a sua exposição sistémica e os seus efeitos farmacológicos, constituindo, por isso, em circunstâncias normais, uma barreira fisiológica benéfica contra xenobióticos, mas indesejável quando se pretende instituir determinados tratamentos farmacológicos (MARCHETTI *et al.*, 2007).

A expressão da gp-P, não só em células tumorais mas também em inúmeros tecidos normais do organismo envolvidos nos processos de absorção, distribuição e eliminação de fármacos, associada ao elevado número de fármacos estruturalmente não relacionados, substratos da gp-P, leva a que muitos autores considerem este transportador de efluxo como o principal factor condicionante de MDR (TAKARA *et al.*, 2006; BANSAL *et al.*, 2009). No entanto, para além da gp-P, outras proteínas transportadoras membranares pertencentes à superfamília ABC parecem estar também envolvidas na captação e extrusão de fármacos anticancerígenos, em particular, as proteínas de resistência a múltiplos fármacos (*multidrug resistance proteins*, MRPs) e a proteína de resistência ao cancro da mama (BCRP) (KUPPENS *et al.*, 2005).

Em resultado do reconhecimento da contribuição significativa da gp-P para o fenómeno da farmacoresistência (SHTIL, 2002), desde a década de 80 que se têm tentado desenvolver estratégias efectivas direccionadas à inibição funcional ou supressão da expressão da gp-P, tendo por objectivo reverter a MDR a ela associada. Todavia, apesar da intensa investigação não-clínica e clínica desenvolvida neste âmbito, incluindo mesmo numerosos ensaios clínicos realizados em co-terapia envolvendo fármacos anticancerígenos e inibidores da gp-P de diferentes gerações, continua por estabelecer uma estratégia capaz de ultrapassar a MDR mediada pela gp-P e cuja relação benefício-risco seja clinicamente favorável (TAKARA *et al.*, 2006; MARCHETTI *et al.*, 2007). Efectivamente, a aplicabilidade clínica de diversos inibidores clássicos da gp-P, como por exemplo o verapamil e a ciclosporina A, mostrou ser limitada. A baixa afinidade destes compostos para a gp-P implica a necessidade de doses elevadas, as quais induzem efeitos tóxicos inaceitáveis. Consequentemente, persiste a necessidade de identificar e desenvolver novos inibidores da gp-P, mais eficazes e seguros, com potencial para minimizar o insucesso terapêutico associado, muitas vezes, à MDR mediada por esta glicoproteína (TAKARA *et al.*, 2006). Neste contexto, estão

actualmente em desenvolvimento clínico alguns inibidores melhorados da gp-P, designados de inibidores da gp-P de terceira geração, sendo também verdade que nos últimos anos a comunidade científica tem considerado a avaliação de diversos extractos de plantas e/ou dos seus constituintes na modulação da actividade e/ou expressão da gp-P (ZHOU *et al.*, 2004; MARCHETTI *et al.*, 2007; BANSAL *et al.*, 2008; BANSAL *et al.*, 2009; ALVAREZ *et al.*, 2010). Considerando que o inibidor ideal da gp-P deva ser um composto não tóxico e desprovido intrinsecamente de outras acções farmacológicas relevantes, a identificação de inibidores efectivos da gp-P entre os constituintes fitoquímicos poderá apresentar-se como uma estratégia promissora capaz de modular a MDR com uma relação benefício-risco favorável (BANSAL *et al.*, 2008).

1.1. A descoberta da glicoproteína-P

O presente ano de 2010 marca o 34º aniversário da descoberta da gp-P por JULIANO e LING (1976).

O principal incentivo conducente à descoberta da gp-P foi a resistência apresentada pelas células tumorais a uma ampla variedade de fármacos anticancerígenos. Este facto deu início à investigação, em vários modelos de células em cultura, de mecanismos capazes de contribuir para o fenómeno de MDR (GOTTESMAN e LING, 2006). Neste contexto, investigaram-se as propriedades de resistência à colchicina em células de ovário de Hamster Chinês. Esta foi a linhagem celular seleccionada porque estas células mantinham um cariótipo aproximadamente normal e relativamente estável em cultura, tinham capacidade para crescer em monocamada e também em suspensão, poderiam ser facilmente sincronizadas para estudos do ciclo celular e, essencialmente, por permitirem o isolamento de mutantes. Efectivamente pretendiam-se obter mutantes com a proteína de ligação à colchicina (tubulina) alterada. No entanto, surpreendentemente, constatou-se que diversas linhas celulares clonadas e caracterizadas com o fenótipo de resistência à colchicina apresentavam também resistência cruzada pleiotrópica (múltipla) a fármacos não relacionados, como a daunomicina e a puromicina. Adicionalmente, todas estas linhas celulares exibiam uma capacidade reduzida para incorporar colchicina, a qual mostrou ser proporcional ao grau de resistência ao fármaco. Porém, a capacidade de ligação da colchicina aos extractos celulares não foi reduzida significativamente. Perante os

resultados obtidos, foi então concluído que a resistência à colchicina decorria, muito provavelmente, de alterações na célula que condicionavam uma redução da permeabilidade à colchicina (GOTTESMAN e LING, 2006).

Face ao conceito de permeabilidade demonstrada em células mutantes resistentes à colchicina, JULIANO e seus colaboradores recorreram a técnicas de biologia molecular com o objectivo de marcar hidratos de carbono da superfície destas células. Esses estudos acabariam por revelar um pico proeminente de 170 kDa específico das células resistentes à colchicina e correspondente a uma glicoproteína da superfície celular, a qual foi designada de glicoproteína de permeabilidade ou glicoproteína-P (gp-P; “P” é a letra inicial de “*permeabilidade*”) (JULIANO e LING, 1976). Mais tarde, tornou-se então evidente que a gp-P é um dos principais responsáveis pelo efluxo activo de fármacos anticancerígenos em linhas celulares resistentes, condicionando, inevitavelmente, uma acumulação intracelular reduzida (MCDEVITT e CALLAGHAN, 2007). A descoberta e a identificação desta glicoproteína como um dos mecanismos associados à MDR representou, possivelmente, uma das contribuições mais significativas para o entendimento da resistência à quimioterapia anticancerígena observada em diversos tipos de células tumorais (GOTTESMAN e LING, 2006). A figura 1 resume as principais etapas subjacentes à descoberta da gp-P e relacionadas com a investigação conducente à sua caracterização e modulação.

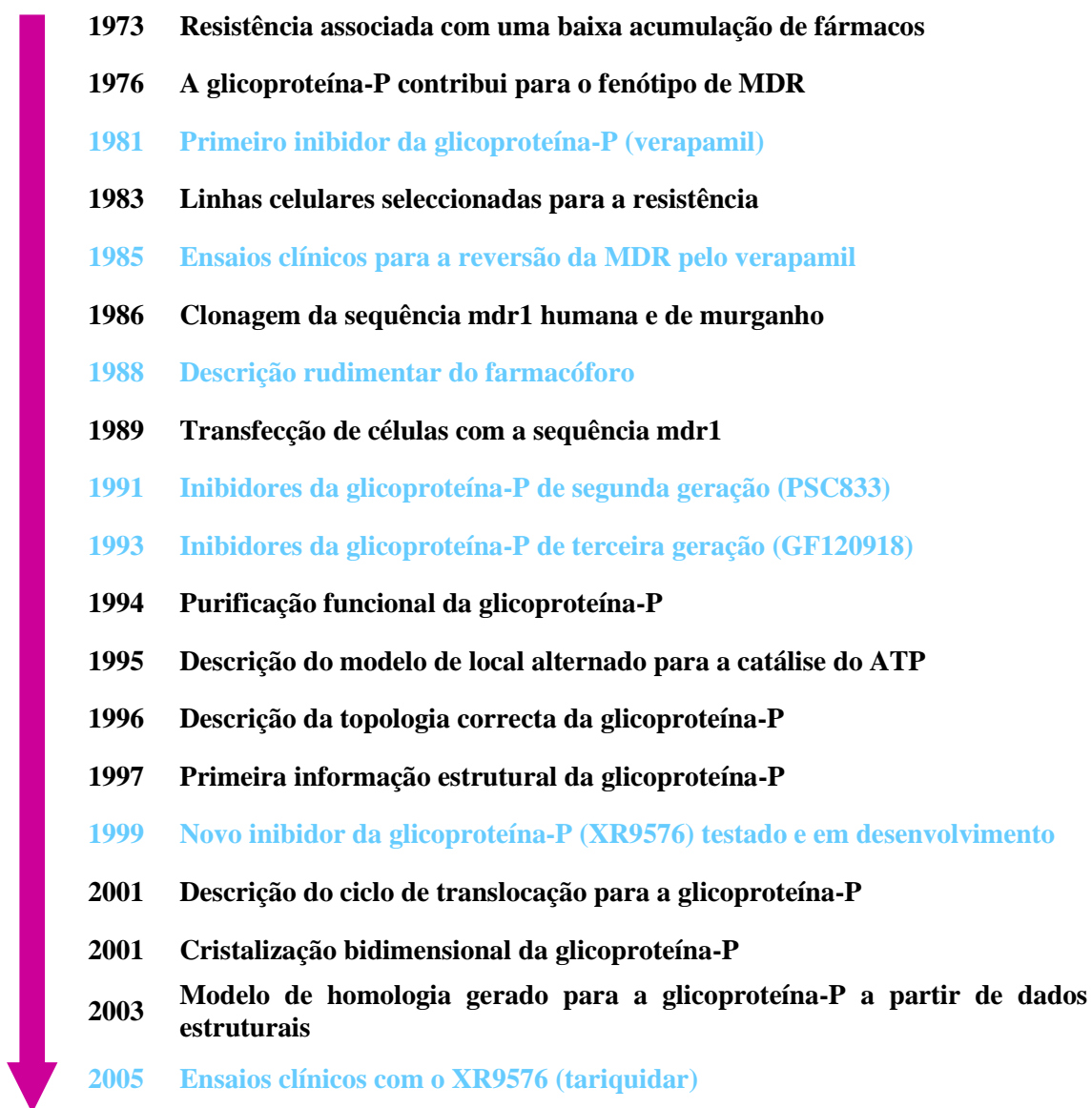


Figura 1. Sumário cronológico dos principais marcos da investigação relacionada com a glicoproteína-P. (Adaptado de MCDEVITT e CALLAGHAN, 2007)

1.2. Estrutura da glicoproteína-P

No homem, a gp-P é codificada por dois genes conhecidos como MDR1 (ABCB1) e MDR3 (ABCB4), localizados em regiões adjacentes no cromossoma 7q21. No entanto, somente o gene MDR1 codifica para a isoforma da gp-P que medeia o efluxo activo de substâncias, incluindo fármacos, e é a única associada à MDR. O gene MDR3 codifica para uma isoforma da gp-P que funciona como fosfatidilcolina translocase ou flipase, sendo responsável pelo efluxo deste fosfolípido para a bÍlis. Por sua vez, em roedores, a gp-P é codificada pelos genes *mdr1a* (*abcb1a*), *mdr1b* (*abcb1b*) e *mdr2* (*abcb4*), sendo o fenÓtipo de MDR conferido somente pelos genes *mdr1a* e *mdr1b*, os quais correspondem, funcionalmente, ao gene MDR1 presente nos humanos. Nos roedores, os três genes *mdr1a*, *mdr1b* e *mdr2* encontram-se agrupados no cromossoma 5 no murganho, enquanto no rato estes genes estão localizados na região cromossÓmica 4q11–12 (ISHIKAWA *et al.*, 2004; DEL AMO *et al.*, 2009).

Desde a identificação da gp-P em 1976, que vários esforços têm sido feitos para elucidar a sua estrutura, pois isso permitiria uma melhor compreensão do seu mecanismo de actuação (LIN e YAMAZAKI, 2003).

A gp-P é sintetizada no retículo endoplasmático como um núcleo glicosilado, com um peso molecular de cerca de 170 kDa. Esta proteína compreende 1280 aminoácidos, sendo expressada como uma cadeia única, contendo duas porções homÓlogas. Cada uma dessas porções é constituída por seis domínios transmembranares, com um local de ligação ao substrato e uma região de ligação ao ATP. As duas regiões de ligação à molécula de ATP, separadas por uma porção polipeptídica flexível de ligação, permitem a transferência da energia necessária para o transporte transmembranar activo de efluxo mediado pela gp-P. Os domínios de ligação ao ATP localizados no citoplasma, também são conhecidos como domínios de ligação de nucleÓtidos (NBDs) (Figura 2). Cada um destes domínios contém três regiões: o motivo Walker A, o motivo Walker B e o motivo de assinatura C (VARMA *et al.*, 2003; ISHIKAWA *et al.*, 2004; BALAYSSAC *et al.*, 2005; HENNESSY e SPIERS, 2007). Para funcionar como um transportador, a gp-P requer também a ligação e hidrólise de magnésio; tem sido proposta a contribuição do magnésio para a estabilização do local de ligação de ATP (LIN e YAMAZAKI, 2003; BANSAL *et al.*, 2009).

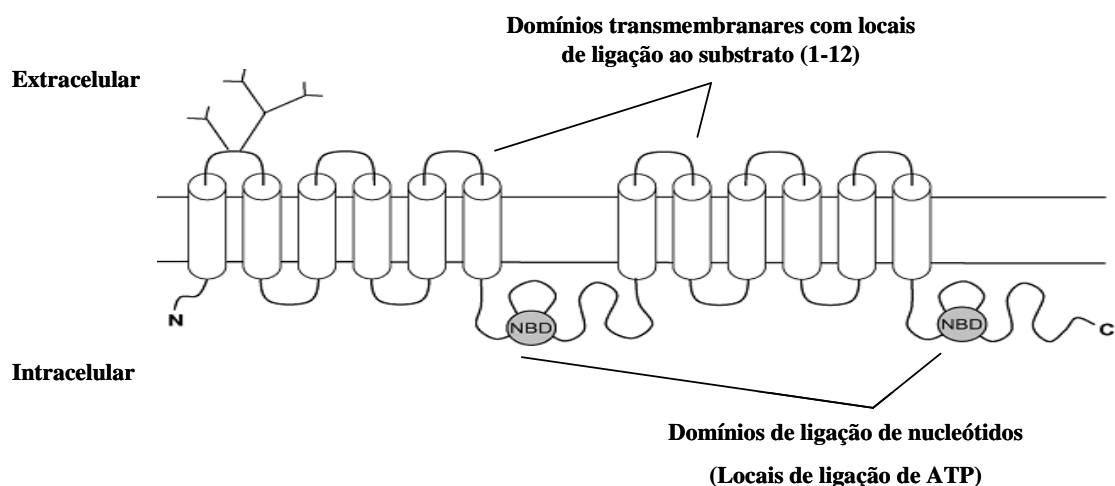


Figura 2. Estrutura da glicoproteína-P. (Adaptado de DEL AMO *et al.*, 2009; BANSAL *et al.*, 2009)

1.3. Mecanismo de efluxo mediado pela glicoproteína-P

A gp-P está localizada na membrana apical das células e medeia o transporte transmembranar activo de efluxo de muitas classes diferentes de xenobióticos, incluindo fármacos estruturalmente muito diversos e pertencentes a diferentes grupos farmacoterapêuticos, por exemplo, anticancerígenos, imunossuppressores, anti-hipertensores, antibióticos e muitos outros (STOUCH e GUDMUNDSSON, 2002).

Vários modelos mecanísticos têm sido propostos com o objectivo de descrever o mecanismo de efluxo de xenobióticos mediado pela gp-P, porém, o local exacto da interacção dos substratos com a proteína não está claramente estabelecido. Entre os modelos propostos incluem-se o *modelo poroso*, o *modelo flipase* e o *modelo do aspirador a vácuo hidrofóbico (hydrophobic vacuum cleaner, HVC)* (Figura 3).

O *modelo HVC* proposto por Gottesman e Pastan em 1993 é, de entre os três, o que tem ganho uma maior aceitação. Segundo este modelo, a gp-P reconhece os substratos hidrofóbicos presentes na parte mais interna da membrana plasmática, promovendo o seu efluxo para o meio extracelular (KRISHNA e MAYER, 2000; VARMA *et al.*, 2003; HENESSY e SPIERS, 2007).

Recentemente, Rosenberg e colaboradores propuseram que a gp-P sofre mudanças conformacionais na sequência da ligação dos nucleótidos aos domínios

intracelulares de ligação de nucleótidos. De acordo com o *modelo poroso*, na ausência de nucleótidos, os domínios transmembranares formam um poro único central que alcança toda a espessura da membrana celular e abre para a superfície extracelular. Contrariamente, na presença de nucleótidos, os domínios transmembranares reorganizam-se em três domínios compactos que abrem o poro central ao longo do seu comprimento, permitindo o acesso directo de xenobióticos hidrofóbicos existentes na bicamada lipídica ao poro central do transportador (VARMA *et al.*, 2003; BANSAL *et al.*, 2009). Foi, no entanto, descrito recentemente que os substratos da gp-P se difundem primeiramente a partir da bicamada lipídica para os locais de ligação aos substratos através de *gates* formados entre os domínios transmembranares 5/8 e 2/11. No *modelo flipase*, postulado em 1992 por Higgins e Gottesman, os substratos existentes na parte interna da membrana plasmática ligam-se ao ATP, sendo posteriormente translocados da porção interna para a porção externa da bicamada lipídica, a partir da qual são difundidos passivamente para o meio extracelular. Quer o *modelo HVC* quer o *modelo flipase* assumem que a partição dos substratos para a fase lipídica ocorre antes da sua interacção com a gp-P (KRISHNA e MAYER, 2000; HENESSY e SPIERS, 2007; BANSAL *et al.*, 2009).

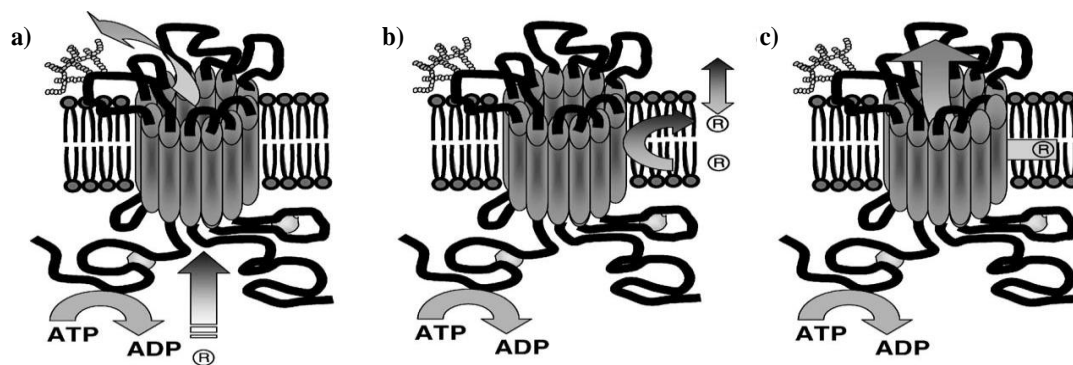


Figura 3. Modelos propostos para explicar o mecanismo de efluxo mediado pela glicoproteína-P: **a)** *modelo poroso*, **b)** *modelo flipase* e **c)** *modelo do aspirador a vácuo hidrofóbico (hydrofobic vacuum cleaner)*. (Adaptado de VARMA *et al.*, 2003).

Já foi referido anteriormente que a gp-P requer energia proveniente da hidrólise do ATP para promover o transporte activo de efluxo dos seus substratos. Concretamente, o mecanismo de transporte de efluxo mediado pela gp-P parece

compreende dois ciclos catalíticos, em que a libertação do difosfato de adenosina (ADP) do local de ligação de nucleótidos finaliza o primeiro ciclo catalítico. Posteriormente, tem lugar uma mudança conformacional que reduz a afinidade da gp-P para os substratos e nucleótidos. O segundo ciclo catalítico inicia-se com a hidrólise de uma outra molécula de ATP, sendo a energia libertada utilizada para restaurar a glicoproteína à sua conformação nativa, ligando-se de novo a ambos, substrato e nucleótidos, permitindo a iniciação do ciclo seguinte (VARMA *et al.*, 2003; BANSAL *et al.*, 2009).

1.4. Distribuição tecidual e função fisiológica da glicoproteína-P

A expressão constitutiva da gp-P na membrana celular apical/luminal das células polarizadas de numerosos tecidos são do organismo, particularmente naqueles com funções excretórias e de barreira, é sugestiva do papel fisiológico que a gp-P desempenha na destoxificação e protecção do organismo contra xenobióticos e metabolitos tóxicos, particularmente hidrofóbicos (Figura 4). De facto, no homem, a gp-P é expressada comumente na superfície membranar dos canalículos biliares hepáticos, nas células epiteliais da mucosa intestinal, na superfície apical das células epiteliais dos túbulos renais e nas células endoteliais capilares especializadas da barreira hematoencefálica, da placenta, dos testículos e dos ovários. A gp-P tem sido também identificada em células da glândula supra-renal e em células sanguíneas como os linfócitos T, entre outras (VARMA *et al.*, 2006; MARCHETTI *et al.*, 2007; BANSAL *et al.*, 2009).

Pela sua distribuição e localização particular nos principais tecidos envolvidos nos processos de absorção e de eliminação de xenobióticos, a gp-P constitui, efectivamente, uma barreira fisiológica funcional importante que dita a cinética de múltiplos xenobióticos. Deste modo, limita a entrada de xenobióticos para a circulação sistémica a partir do intestino, promove a sua eliminação hepática, minimiza a sua distribuição para órgãos vitais (para o cérebro, por exemplo) e limita a sua reabsorção para a circulação sistémica a partir dos túbulos renais (OZVEGY-LACZKA *et al.*, 2005; VARMA *et al.*, 2006). Assim, em condições fisiológicas a gp-P apresenta-se como uma barreira funcional benéfica minimizando a exposição sistémica aos xenobióticos, mas apresenta-se também como uma barreira indesejável e a ultrapassar quando se

pretendem instituir determinados tratamentos farmacológicos envolvendo fármacos substratos da gp-P (MARCHETTI *et al.*, 2007).

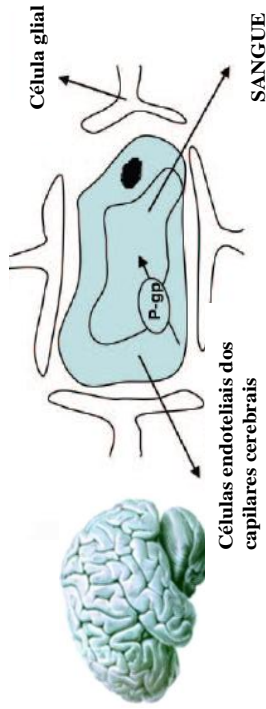
É de salientar, no entanto, que a gp-P medeia também o transporte activo de efluxo de outros compostos hidrofóbicos para além de xenobióticos, como por exemplo lípidos, hormonas esteróides e péptidos (CASCORBI, 2006).

1.5. Expressão da glicoproteína-P nas células tumorais

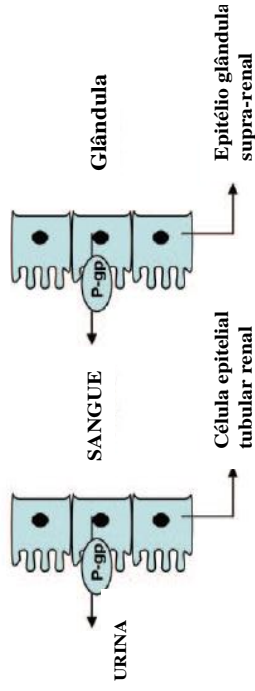
A resistência intrínseca (presente antes da exposição inicial à quimioterapia) ou adquirida (ao longo do decurso de tratamento) das células tumorais de diferentes tipos de cancro aos fármacos anticancerígenos é um obstáculo importante que contribui para o insucesso terapêutico em mais de 90% dos doentes com cancro (OZVEGY-LACZKA *et al.*, 2005; OZBEN, 2006; COLEY, 2009). No entanto, muitas vezes, as células cancerígenas manifestam resistência cruzada pleiotrópica a fármacos anticancerígenos estruturalmente e funcionalmente não relacionados, mesmo antes de serem expostas a esses fármacos, ou seja, apresentam um fenótipo de MDR (PLOUZEK *et al.*, 1999; OZBEN, 2006).

Vários têm sido os mecanismos descritos para explicar o fenómeno de MDR, nomeadamente, a sequestração de fármacos por alguns compartimentos intracelulares, a activação de enzimas de destoxificação, a modificação dos locais de ligação ao fármaco, alterações nos mecanismos de reparação do DNA, a inibição de vias de sinalização apoptóticas e, particularmente, a sobreexpressão de transportadores de efluxo dependentes de energia que promovem a extrusão de fármacos anticancerígenos. Entre estes transportadores de efluxo, a gp-P sobreexpressada por muitas células cancerígenas resistentes à quimioterapia é, seguramente, aquele com maior relevância clínica no âmbito do desenvolvimento do fenótipo de MDR (GOTTESMAN *et al.*, 1996; COLEY, 2009). De facto, embora a gp-P desempenhe funções fisiológicas essenciais ao mediar determinados processos de transporte, é também verdade que a sobreexpressão desta glicoproteína em células tumorais condiciona uma acumulação intracelular reduzida dos fármacos anticancerígenos, por mediar o efluxo activo dos mesmos (Figura 4) (KRISHNA e MAYER, 2000; MARCHETTI *et al.*, 2007).

BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

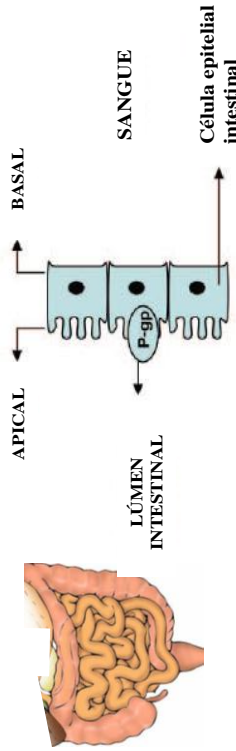


SUPRA-RENAL

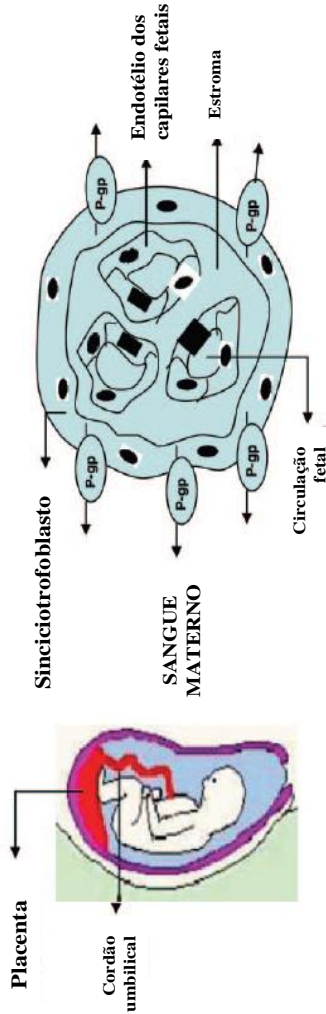


RIM

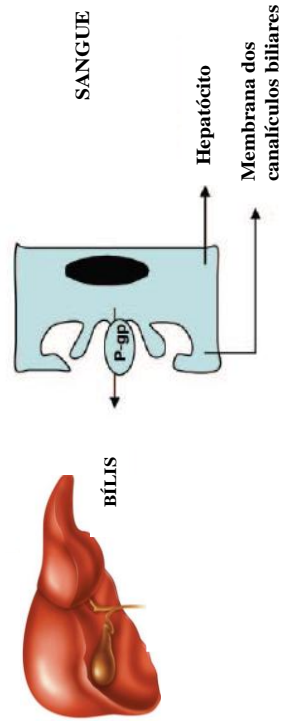
INTESTINO



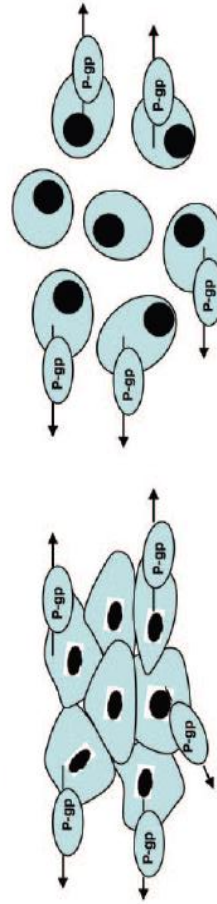
PLACENTA



FÍGADO



LINFÓCITOS



TUMOR

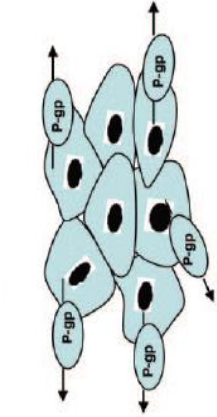


Figura 4. Representação esquemática dos principais tecidos de expressão e localização da glicoproteína-P (P-gp). (Adaptado de MARCHETTI *et al.*, 2007)

Os fármacos anticancerígenos mais frequentemente associados com o fenómeno MDR são hidrofóbicos e incluem compostos pertencentes ao grupo dos taxanos (paclitaxel e docetaxel), dos alcalóides da vinca (vinorelbina, vincristina e vimblastina), das antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina e epirrubicina), das epidofilotoxinas (etopósido e tenipósido), dos antimetabolitos (metotrexato, 5-fluorouracilo e 6-mercaptopurina) e ainda o topotecano, a dactinomicina e a mitomicina C, entre muitos outros (OZBEN, 2006).

A expressão da gp-P é especialmente elevada nos tumores de tecidos que expressam fisiologicamente este transportador, tais como nos carcinomas do cólon, rim, glândula supra-renal, pâncreas e fígado. Níveis intermédios de expressão da gp-P têm sido encontrados, no momento do diagnóstico, em alguns neuroblastomas e carcinomas dos tecidos moles e também em algumas neoplasias malignas hematológicas. Por outro lado, os tumores do pulmão, esófago, estômago, ovário e mama, melanomas, linfomas, mielomas múltiplos e algumas leucemias exibem uma expressão baixa de gp-P. Porém, após tratamentos de quimioterapia, uma elevada incidência da expressão da gp-P foi demonstrada em tumores da mama, leucemias mielóides agudas, linfomas e mielomas. A positividade à gp-P em alguns tipos de cancro está também associada a níveis elevados de expressão de outros marcadores de resistência a fármacos, tais como as MRPs e as *glutathione-S-transferases* da classe pi (BANSAL *et al.*, 2009).

Perante o fenótipo de MDR manifestado por muitos tipos de células cancerígenas, uma ampla diversidade de compostos designados de quimiossensibilizadores foi identificada como o objectivo de reverter a condição de MDR. O uso de quimiossensibilizadores, em combinação com fármacos anticancerígenos clássicos, marca uma estratégia possível e promissora na abordagem farmacológica de tumores resistentes à quimioterapia. Neste contexto, uma atenção especial tem sido atribuída à inibição da actividade da gp-P ao longo dos últimos anos (BANSAL *et al.*, 2009; COLEY, 2009).

1.6. A glicoproteína-P e as suas implicações farmacocinéticas

A via oral constitui a via mais popular para a administração de fármacos, sendo que, muitos deles, são absorvidos maioritariamente no intestino delgado (CHAN *et al.*, 2004). Também é verdade que alguns fármacos são incapazes de exercerem as suas acções farmacológicas quando administrados por via oral, particularmente em resultado de uma biodisponibilidade reduzida, relacionada, especialmente, com problemas de solubilidade nos fluidos gastrointestinais, com a baixa permeabilidade através da parede intestinal e com um elevado metabolismo pré-sistémico quer no tracto gastrointestinal quer na primeira passagem pelo fígado (SHEN *et al.*, 2006). Assim, mediante a administração de fármacos por vias extravasculares, incluindo a via oral, estes só serão eficazes se apresentarem uma biodisponibilidade suficiente capaz de proporcionar concentrações adequadas na biofase (local de acção) (DEL AMO *et al.*, 2009).

Actualmente, logo desde as etapas mais precoces dos programas de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, uma atenção especial tem sido atribuída à avaliação do potencial de absorção intestinal e do metabolismo dos novos candidatos a fármacos. Pois, moléculas com propriedades farmacocinéticas favoráveis, ou seja, capazes de passar através de biomembranas e metabolicamente estáveis, são potencialmente mais promissoras, apresentando, em perspectiva, uma maior biodisponibilidade. No entanto, para além das propriedades físico-químicas das moléculas (pKa, peso molecular, lipofilia e solubilidade, entre outras), também são diversos os factores biológicos que podem condicionar a biodisponibilidade oral, nomeadamente, a velocidade do trânsito gastrointestinal, o pH dos fluidos gastrointestinais, a permeabilidade e a taxa de fluxo sanguíneo na parede do tracto gastrointestinal e o metabolismo de primeira passagem intestinal e hepático. Concretamente, descendo ao nível celular e molecular, reconhece-se também que a biodisponibilidade oral pode ser reduzida significativamente, em muitos casos, pela existência de sistemas na membrana plasmática celular que medeiam mecanismos de transporte activo de efluxo, tais como a gp-P, que parecem actuar em sinergismo com a actividade metabolizadora de enzimas intracelulares, sobretudo com as isoenzimas do citocromo P450 (LIN e YAMAZAKI, 2003; KNIGHT *et al.*, 2006).

Em termos gerais, a absorção intestinal de fármacos pode ocorrer por um dos seguintes processos ou pela sua combinação: difusão passiva (transcelular ou

paracelular) e/ou transporte de influxo mediado por transportadores (HUNTER e HIRST, 1997; LIN e YAMAZAKI, 2003; DEL AMO *et al.*, 2009). Na realidade, muitos dos fármacos administrados oralmente atingem a circulação por difusão passiva transcelular, sobretudo aqueles com propriedades lipofílicas. Porém, aqueles que são substratos da gp-P são susceptíveis de sofrerem transporte transmembranar activo de efluxo, com redução da sua absorção efectiva; uma vez no interior dos enterócitos algumas moléculas de fármaco, em lugar de continuarem a difundir-se para os capilares sanguíneos de acordo com o gradiente de concentração, são expulsas para o lúmen intestinal num processo mediado pela gp-P. Portanto, a gp-P expressada pelas células epiteliais da mucosa intestinal e dos canalículos biliares hepáticos, determina, desde logo, a absorção sistémica de substratos administrados por via oral. Por outro lado, como a gp-P é expressada também em outros tecidos com funções importantes de excreção, como nas células epiteliais dos túbulos renais, mesmo as moléculas de fármaco que atinjam a circulação sistémica ficam sujeitas a fenómenos de efluxo mediados pela gp-P na sua passagem pelos rins (ocorrendo excreção urinária) e mesmo nas passagens adicionais pelo fígado (ocorrendo excreção biliar) (CHAN *et al.*, 2004, LIN e YAMAZAKI, 2003; DEL AMO *et al.*, 2009).

Perante a distribuição tecidual e localização celular da gp-P, é evidente que esta proteína pode condicionar a biodisponibilidade e a farmacocinética de muitos fármacos. Por outro lado, a implicação da gp-P na cinética de fármacos pode tornar-se ainda mais relevante, dada a sobreposição que parece existir entre a gp-P e a isoenzima 3A4 do citocromo P450 (CYP 3A4, principal isoenzima metabolizadora de fármacos), em termos de especificidade de substratos, co-localização e similaridade nas funções de destoxificação. Nos últimos anos, muitos estudos têm-se focado no entendimento da interacção entre a gp-P e a isoenzima CYP 3A4, as quais constituem duas barreiras funcionais contra xenobióticos, incluindo muitos fármacos, cuja extensão de exposição sistémica e o comportamento cinético é por elas condicionado (AGORAM *et al.*, 2001; PAL e MITRA, 2006). Além disso, a inibição ou a indução da gp-P podem também ter sérias implicações na eficácia e na segurança de fármacos que dela são substratos. Todavia, a inibição da actividade funcional da gp-P ou a redução da sua expressão pensa-se poder constituir uma estratégia promissora numa tentativa de ultrapassar a resistência à farmacoterapia evidenciada por diversas condições patológicas, em especial no cancro.

1.7. A inibição da glicoproteína-P

Tem-se reconhecido que uma das principais limitações ao sucesso da quimioterapia anticancerígena é a MDR desenvolvida pelas células tumorais de muitos tipos de cancro. Este fenómeno parece resultar, pelo menos em grande parte, da sobreexpressão de determinadas proteínas membranares com funções de transporte activo de efluxo, nomeadamente da gp-P. Estas proteínas promovem a extrusão transmembranar dos fármacos anticancerígenos, diminuindo as suas concentrações intracelulares nas células tumorais (THOMAS *et al.*, 2003). Deste modo, a inibição da actividade da gp-P e/ou a redução da sua expressão poderão constituir aproximações para reverter o fenótipo de MDR (VERSCHAAGEN *et al.*, 1999). Com a inibição da actividade da gp-P espera-se, efectivamente, um aumento da extensão de exposição sistémica aos fármacos substratos da gp-P, quer por ocorrer um acréscimo da sua absorção sistémica quer por ser reduzir a sua velocidade de eliminação, ou seja, verifica-se um aumento da sua biodisponibilidade (THOMAS *et al.*, 2003; VARMA *et al.*, 2003). Hoje em dia, apesar de já estarem identificados diversos compostos com potencial para reverter a MDR mediada pela gp-P, a verdade é que isso só é conseguido mediante o uso de doses muito elevadas, as quais resultam em toxicidade inaceitável (VERSCHAAGEN *et al.*, 1999; THOMAS *et al.*, 2003).

1.7. 1. Inibidores da glicoproteína-P de primeira geração

Os inibidores da gp-P de primeira geração são compostos que, para além de terem mostrado inibir a gp-P, são também utilizados como fármacos para outros fins terapêuticos. A inibição da gp-P, bem como de outros transportadores da superfamília ABC, tem vindo a ser investigada desde o início da década de 80 (BANSAL *et al.*, 2009). O primeiro estudo com vista à modulação farmacológica da gp-P foi realizado em 1980 por TSURUO e colaboradores (1981). Este estudo demonstrou que o verapamil (um bloqueador dos canais de cálcio) pode sensibilizar as células leucémicas P388 de murino aos fármacos anticancerígenos vincristina e vimblastina, constatando-se um aumento da sua acumulação intracelular (TSURUO *et al.*, 1981). O verapamil, mediante administração oral, proporcionou também um aumento das concentrações plasmáticas e do volume de distribuição da doxorrubicina e reduziu a velocidade de eliminação do

fármaco. No entanto, as concentrações requeridas de verapamil para a reversão efectiva da gp-P induziram toxicidade cardiovascular significativa (VARMA *et al.*, 2003).

Para além do verapamil, muitos outros fármacos não relacionados quimicamente e de interesse clínico diverso foram testados com o objectivo de modular a MDR. Entre eles incluem-se imunossuppressores (ciclosporina A), antibióticos (eritromicina), antimaláricos (quinina), antipsicóticos (*trans*-flupentixol e clorpromazina), alcalóides indólicos (flufenazina e reserpina), esteróides (progesterona) e anti-esteróides (tamoxifeno), anti-arrítmicos (quinidina) e outros bloqueadores dos canais de cálcio (felodipina, nifedipina e diltiazem) (OZBEN *et al.*, 2006; BANSAL *et al.*, 2009). Na figura 5 representam-se as estruturas químicas de alguns dos principais inibidores da gp-P de primeira geração, demonstrando-se, indiscutivelmente, a ampla diversidade estrutural.

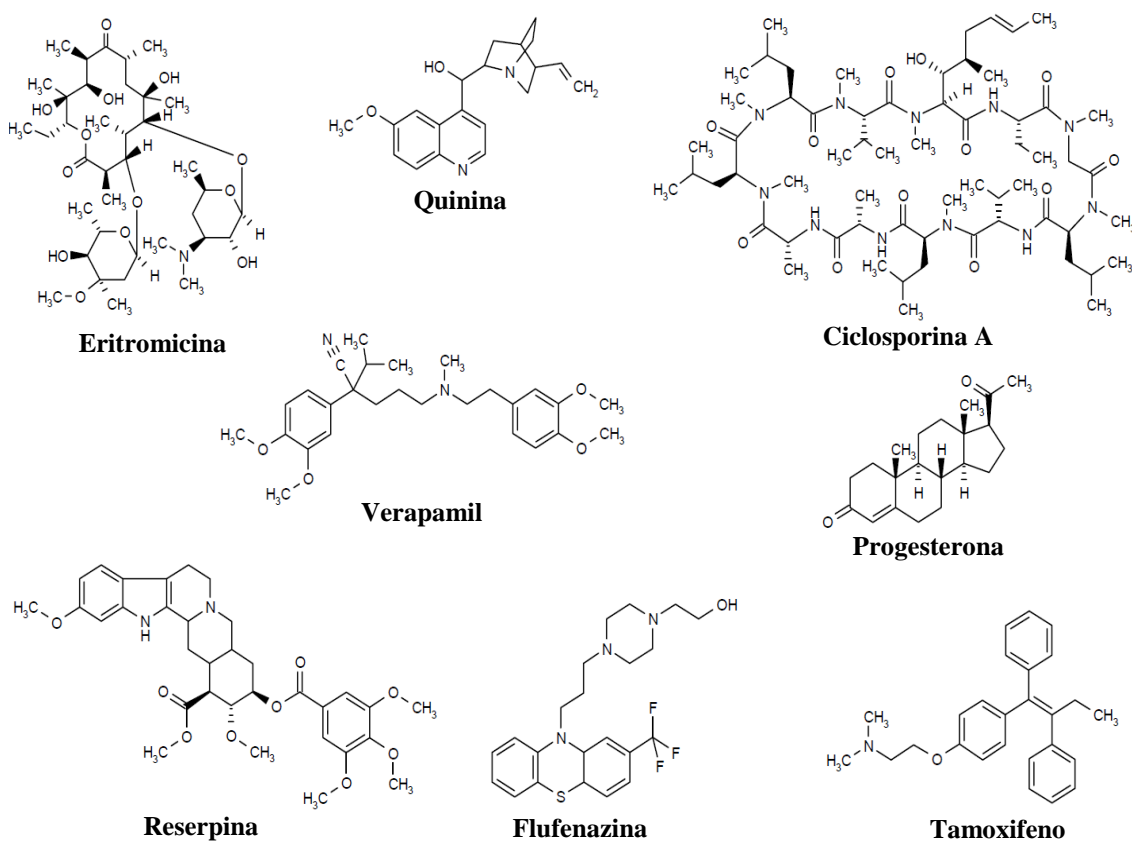


Figura 5. Inibidores da glicoproteína-P de primeira geração. (Adaptado de LISCOVITCH e LAVIE, 2002).

De um modo geral, os ensaios clínicos com os inibidores da gp-P de primeira geração falharam por várias razões, sendo as mais proeminentes a sua baixa potência associada à sua baixa afinidade para a gp-P. Assim, a aplicação clínica destes inibidores foi mal sucedida pela toxicidade inerente às concentrações séricas necessárias para promover a inibição efectiva da gp-P (THOMAS *et al.*, 2003; OZBEN *et al.*, 2006). Por outro lado, interacções farmacocinéticas foram também observadas como resultado da inibição concomitante da isoenzima CYP 3A4 (BREEDVELD *et al.*, 2006). Para ultrapassar estas limitações, vários análogos destes inibidores de primeira geração foram sintetizados e testados como o objectivo de identificar moduladores da gp-P mais potentes, menos tóxicos e mais selectivos (THOMAS *et al.*, 2003; TAKARA *et al.*, 2006).

1.7. 2. Inibidores da glicoproteína-P de segunda geração

Os inibidores da gp-P de segunda geração foram desenhados com o objectivo de obter compostos melhorados comparativamente aos de primeira geração. Muitos destes inibidores de segunda geração são análogos estruturais dos inibidores de primeira geração, apresentando, porém, uma maior afinidade para a gp-P (THOMAS *et al.*, 2003; BREEDVELD *et al.*, 2006).

Entre os inibidores da gp-P de segunda geração incluem-se o dexverapamil (enantiómero *R* do verapamil sem efeitos relevantes no sistema cardiovascular), o galopamil, o valsopodar (análogo da ciclosporina A sem propriedades imunossupressoras), o biricodar, o GF120918 (um derivado acridonacarboxamida), o MS-209 (um derivado quinolona), o S9788 (um derivado da triazinoaminopiperidina), a reversina 121 e a reversina 125 (THOMAS *et al.*, 2003; BANSAL *et al.*, 2009). O valsopodar constitui o inibidor da gp-P de segunda geração mais estudado e melhor caracterizado, exibindo uma potência cerca de 20 vezes superior à ciclosporina A enquanto inibidor da gp-P (VARMA *et al.*, 2003). Os ensaios clínicos iniciais com o valsopodar foram encorajadores, porém, ensaios adicionais evidenciaram interacções farmacocinéticas relevantes e imprevisíveis com múltiplos fármacos anticancerígenos e a provável inibição de transportadores não relacionados com a MDR. Consequentemente, o desenvolvimento clínico deste composto foi interrompido. Em termos gerais, todos os inibidores da gp-P de segunda geração mostraram maior potência e menor toxicidade que os seus precursores. Todavia, apesar de alguns terem

evidenciado em ensaios clínicos a reversão da MDR a alguns fármacos anticancerígenos, o potencial elevado para interações farmacocinéticas imprevisíveis com os substratos da isoenzima CYP 3A4 limitaram a sua aplicação clínica (THOMAS *et al.*, 2003).

1.7. 3. Inibidores da glicoproteína-P de terceira geração

Os inibidores da gp-P de terceira geração têm sido desenvolvidos com base em estudos de relação estrutura-atividade e aplicando técnicas de química combinatorial, pretendendo-se a identificação de moléculas promissoras e melhoradas comparativamente aos inibidores da gp-P de segunda geração, ou seja, que sejam capazes de ultrapassar o fenótipo de MDR manifestado pelas células tumorais em diferentes tipos de cancro (THOMAS *et al.*, 2003; BANSAL *et al.*, 2009). Os inibidores da gp-P de terceira geração são específicos para a gp-P e extremamente potentes, exibindo actividade inibitória em concentrações da ordem de nanomolar. Talvez pela sua elevada especificidade para gp-P, até ao momento, nenhum dos inibidores de terceira geração testados mostrou alterações significativas no perfil farmacocinético plasmático de diversos fármacos anticancerígenos. A ausência de interações com a isoenzima CYP 3A4 é uma vantagem extremamente relevante dos inibidores da gp-P de terceira geração em relação aos inibidores de segunda geração, pois minimiza o risco de interações com fármacos anticancerígenos, não sendo requerido o ajuste das doses previamente estabelecidas para estes fármacos (BANSAL *et al.*, 2009).

Entre os inibidores da gp-P de terceira geração incluem-se o tariquidar (XR9576), o zosuquidar (LY335979), o laniquidar (R101933), o elacridar (GF-120918) e o OC 144-093, entre outros (THOMAS *et al.*, 2003; BANSAL *et al.*, 2009). O tariquidar constitui o inibidor da gp-P de terceira geração mais promissor, particularmente por apresentar uma potência 100 a 1000 vezes superior aos inibidores da gp-P das gerações anteriores, uma longa duração de acção e a capacidade para discriminar a gp-P de outras proteínas que medeiam mecanismos de transporte transmembranar de efluxo. No entanto, para além do tariquidar, muitos outros inibidores da gp-P de terceira geração estão em fase adiantada de desenvolvimento clínico (MCDEVITT e CALLAGHAN, 2007).

De facto, embora sejam indiscutíveis as propriedades farmacológicas melhoradas dos inibidores da gp-P de terceira geração em relação aos inibidores da gp-P das gerações precedentes, é também verdade que alguns dos compostos de terceira geração já submetidos a ensaios clínicos de fase III mostraram resultados comprometedores. Consequentemente, alguns autores que desenvolvem investigação nesta área têm sugerido recentemente que a procura de inibidores da gp-P entre os componentes fitoquímicos de extractos de plantas poderá ser uma estratégia alternativa e promissora. Efectivamente, alguns fitoquímicos pertencentes às classes dos flavonóides e monoterpénóides já despertaram a atenção como potenciais inibidores da gp-P. Estes compostos apresentam, provavelmente, as características consideradas ideais para os inibidores da gp-P: ausência de outras propriedades farmacológicas relevantes, além da inibição da gp-P, e ausência de toxicidade. Por isso, estes compostos fitoquímicos têm sido recentemente considerados candidatos com potencial para promover um aumento da biodisponibilidade de fármacos substratos da gp-P e, consequentemente, com potencial para ultrapassar ou atenuar a condição de MDR (BANSAL *et al.*, 2009).

1.7.4. Inibição da glicoproteína-P por extractos ou constituintes de plantas

A utilização terapêutica de plantas com propriedades medicinais é uma prática comum que acompanha o Homem desde as civilizações ancestrais. Os suplementos ou medicamentos à base de plantas são considerados seguros pela população em geral dada a origem natural dos seus constituintes. Estima-se que mais de 80% da população mundial recorra a preparações à base de plantas para tratar condições patológicas mais comuns como a gripe, estados inflamatórios, doenças cardiovasculares, diabetes e perturbações do sistema nervoso central (ZHOU *et al.*, 2007).

Muitos grupos científicos têm estudado o efeito benéfico de produtos naturais na prevenção ou tratamento do cancro, inclusive, nos últimos anos, tem-se explorado o potencial de inibição da gp-P por extractos ou constituintes de plantas medicinais, existindo já alguns dados que corroboram esta estratégia na reversão do fenótipo de MDR apresentado por diversos tipos de células tumorais, sensibilizando-as para a quimioterapia anticancerígena convencional. De seguida, são discutidos alguns

exemplos mais proeminentes de extractos de plantas e/ou dos seus constituintes que demonstraram inibir a função e/ou expressão da gp-P em diversos modelos experimentais.

1.7.4.1. *Rosmarinus officinalis*

O *Rosmarinus officinalis*, vulgarmente conhecido como alecrim, é comumente usado na culinária pelas suas propriedades condimentares. Porém, pela presença entre os seus constituintes de compostos fenólicos com elevada actividade antioxidante, o interesse no alecrim como antioxidante natural em alimentos tem crescido. Além da actividade antioxidante, os constituintes fitoquímicos do alecrim parecem apresentar também propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e anticancerígenas. Perante estas observações, extractos de *Rosmarinus officinalis* têm sido avaliados em modelos animais e indicaram ser antimutagénicos e não tóxicos (PLOUZEK *et al.*, 1999; NABEKURA *et al.*, 2010).

Um estudo *in vitro* realizado por PLOUZEK e colaboradores (1999) demonstrou que a fracção metanólica do extracto de *Rosmarinus officinalis* promove a acumulação intracelular de fármacos anticancerígenos como a doxorubicina e a vimblastina em células MCF-7 (linha celular humana de adenocarcinoma da mama) resistentes a fármacos. Estes autores sugeriram que o extracto de *Rosmarinus officinalis* inibe a actividade da gp-P (PLOUZEK *et al.*, 1999). Num outro estudo, NABEKURA *et al.* (2010) investigaram o efeito de alguns constituintes fitoquímicos do *Rosmarinus officinalis* (ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico e ácido ursólico) na actividade da gp-P, usando como modelo células KB-C2 de carcinoma humano que sobreexpressam esta glicoproteína. Os resultados deste estudo demonstraram que o ácido carnósico, o carnosol e o ácido rosmarínico induziram a acumulação intracelular de daunorrubicina e rodamina 123 (substratos da gp-P) e esta acumulação foi dependente da dose. Além disso, as células KB-C2 foram sensibilizadas pelo ácido carnósico à citotoxicidade mediada pela vimblastina. Estes resultados são sugestivos do interesse potencial de alguns constituintes fitoquímicos do *Rosmarinus officinalis*, em particular do ácido carnósico, na reversão do fenótipo de MDR mediado pelo gp-P (NABEKURA *et al.*, 2010).

1.7.4.2. *Curcuma longa*

Os rizomas da *Curcuma longa*, vulgarmente conhecida como açafrão-da-terra, curcuma, turmérico, açafrão-da-índia, açafoa ou gengibre amarelo, têm sido muito utilizados na alimentação e na medicina tradicional no leste da Ásia devido ao seu largo espectro de propriedades farmacológicas (HOU *et al.*, 2008; AMPAVASATE *et al.*, 2010). Estes rizomas, para além de melhorarem a cicatrização de feridas e promoverem a digestão, parecem possuir também propriedades anticancerígenas, antioxidantes, hepatoprotectoras, antialérgicas e antidepressivas. A curcumina [1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona] é um composto fenólico e é o principal pigmento encontrado nos rizomas da *Curcuma longa*. Este composto apresenta uma vasta variedade de acções farmacológicas, as quais incluem efeitos anticarcinogénicos e antimutagénicos demonstrados *in vitro*, efeitos hipocolesterolemiantes em ratos e hipoglicemiantes em humanos (ANUCHAPREEDA *et al.*, 2002; HOU *et al.*, 2008). A toxicidade de extractos de *Curcuma longa* tem também sido avaliada em vários modelos animais e, aparentemente, esta planta não induz efeitos tóxicos mesmo quando usada em doses elevadas. Por todas estas razões, os efeitos da curcumina na expressão e actividade da glicoproteína-P têm vindo a ser investigados (ANUCHAPREEDA *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por ANUCHAPREEDA *et al.* (2002) evidenciou que a exposição à curcumina de células KB-V1 de carcinoma cervical humano resistentes a múltiplos fármacos reduz significativamente a expressão da gp-P e estes efeitos são dependentes da dose. O efeito da curcumina na actividade da gp-P neste modelo celular foi também observado pela acumulação intracelular de rodamina 123 (substrato clássico da gp-P). Por outro lado, a sensibilidade das células à vimblastina também aumentou com a exposição à curcumina (ANUCHAPREEDA *et al.*, 2002). A curcumina também inibiu significativamente o efluxo da digoxina (substrato clássico da gp-P) mediado pela gp-P em células L-MDR1 (células LLC-PK1 transfectadas com o gene MDR1 humano) e em células Caco-2 (linha celular de adenocarcinoma colorrectal humano) (AMPAVASATE *et al.*, 2010). Assim, a curcumina parece ser capaz de modular a expressão e a função da gp-P *in vitro*, podendo ser um potencial candidato para a quimiossensibilização de células cancerígenas.

1.7.4.3. *Panax ginseng*

O *Panax ginseng*, largamente usado no oriente como produto medicinal natural devido às suas propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias, cardiovasculares e revitalizantes, tem ganho popularidade no ocidente nos últimos anos (KIM *et al.*, 2003; COON e ERNST, 2002). Os principais constituintes activos do *Panax ginseng* são os ginsenosídeos, derivados triterpenóides. O ginsenosídeo Rh₂, presente apenas no ginseng vermelho, mostrou ser citotóxico em várias células cancerígenas. Além disso, o ginsenosídeo Rh₂ induz a apoptose em células de hepatoma humano. O ginsenosídeo Rg₃, uma saponina do ginseng vermelho, mostrou ter uma actividade inibidora potente em células KBV20C de carcinoma de fibroblastos humanos, tendo demonstrado capacidade para inibir o seu crescimento. Neste contexto, KIM *et al.* (2003) realizaram um estudo com o objectivo de avaliar a inibição da gp-P pelo ginsenosídeo Rg₃ e determinar a sua eficácia *in vivo*. Estes autores acabaram por demonstrar que o Rg₃ promove a acumulação intracelular de rodamina 123 em células KBV20C resistentes. Além disso, o Rg₃ mostrou inibir o efluxo da vimblastina e reverteu a resistência à doxorrubicina e à vincristina nestas células, sugerindo que o Rg₃ compete com os fármacos anticancerígenos para o transporte de efluxo mediado pela gp-P (KIM *et al.*, 2003). A quimiossensibilização e os efeitos mediados por outros constituintes do ginseng (ginsenosídeos protopanaxadiol, protopanaxatriol, Rb-1, Rb-2, Rc, Rg₁ e Re) na acumulação intracelular de fármacos substratos da gp-P também foram testados em linhas celulares de leucemia resistentes à daunorrubicina e à doxorrubicina que sobreexpressam a gp-P. O protopanaxatriol, em particular, mostrou induzir citotoxicidade ao promover a acumulação intracelular de daunorrubicina, provavelmente, por inibição directa com a gp-P (CHOI *et al.*, 2003). Os ginsenosídeos Rg₁, Re, Rc e Rd também evidenciaram um efeito inibidor da gp-P, aumentando a acumulação intracelular de fármacos e a expressão de antigénios tumorais.

1.7.4.4. *Camellia sinensis*

A *Camellia sinensis*, vulgarmente conhecida como chá verde, possui na sua composição um elevado teor em polifenóis. As catequinas são os principais polifenóis encontrados na *Camellia sinensis*. Estes compostos possuem propriedades

quimioprotectoras, anti-aterogénicas, anticancerígenas, antimicrobianas e antioxidantes (JODOIN *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2002). As catequinas mais abundantes na *Camellia sinensis* são o 3-epigalocatequina galato, o 3-epicatequina galato, a 3-epigalocatequina, a 3-epicatequina, o 3-catequinagalato e a (+)-catequina. Uma vez que estes compostos parecem exercer efeitos anticancerígenos, eles têm sido frequentemente estudados com o objectivo de avaliar os seus efeitos na função da gp-P. JODOIN e seus colaboradores (2002) investigaram o efeito de polifenóis da *Camellia sinensis*, sobretudo algumas catequinas, e os resultados então obtidos indicaram que estes compostos interagem com a gp-P em células de ovário de hamster chinês resistentes (CHRC5) e em células Caco-2, inibindo o efluxo de rodamina 123 e de vimblastina mediado pela gp-P (JODOIN *et al.*, 2002). Um outro estudo efectuado por WANG *et al.* (2002) também indicou que a epicatequina inibe o efluxo de rodamina 123. Estes resultados sugerem que os polifenóis presentes na composição da *Camellia sinensis* podem ser potenciais moduladores da biodisponibilidade e da exposição celular a substratos da gp-P, incluindo fármacos anticancerígenos (WANG *et al.*, 2002).

1.7.4.5. Produtos e fitoquímicos de espécies do género *Citrus*

1.7.4.5.1. Sumo de toranja

Ao longo dos anos tem sido sistematicamente descrito que a ingestão de sumo de toranja pode aumentar a biodisponibilidade de alguns fármacos e, a inibição da isoenzima CYP 3A4 tem sido sugerida como o mecanismo mais provável subjacente a este efeito. Uma vez que a isoenzima CYP 3A4 e a gp-P parecem partilhar uma vasta variedade de substratos, o sumo de toranja pode também afectar o transporte de efluxo de fármacos mediado pela gp-P (DI MARCO *et al.*, 2002; ROMITI *et al.*, 2004; GLAESER *et al.*, 2006). Estudos realizados por WANG *et al.* (2001) vieram apoiar a hipótese de alguns constituintes do sumo de toranja poderem inibir a actividade da gp-P (WANG *et al.*, 2001). TAKANAGA e colaboradores (1998) também demonstraram que a naringina e a naringenina, constituintes presentes no sumo de toranja, reduzem o efluxo de vimblastina em células Caco-2. Por outro lado, o próprio sumo de toranja também promoveu a acumulação intracelular de vimblastina nas células Caco-2 e de maneira dependente da dose. Simultaneamente, também foi examinado o efeito inibidor de

diversos extractos orgânicos de sumo de toranja e os resultados mais promissores no que respeita à inibição da gp-P foram conseguidos com o extracto de acetato de etilo, sugerindo que este extracto poderia conter potentes inibidores da gp-P (TAKANAGA *et al.*, 1998). DE CASTRO *et al.* (2007) também investigaram em monocamadas de células Caco-2 a interferência de diversos constituintes do sumo de toranja (bergamotina, 6',7'-dihidroxi-bergamotina, 6',7'-epoxi-bergamotina, naringina e naringenina) no transporte de efluxo do talinolol (um substrato da gp-P). A permeabilidade ao talinolol foi inibida selectivamente pelos diferentes constituintes do sumo de toranja, com a furanocumarina 6',7'-epoxi-bergamotina a evidenciar-se como o inibidor mais potente (DE CASTRO *et al.*, 2007). ROMITI *et al.* (2004) em estudos realizados com dois constituintes do sumo de toranja, os flavonóides caempferol e naringenina, na linha celular HK-2 de células tubulares proximais derivadas de rim humano, as quais expressam quantidades apreciáveis de gp-P, demonstraram que estes dois fitoquímicos induzem uma diminuição significativamente na expressão da gp-P nestas células (ROMITI *et al.*, 2004).

1.7.4.5.2. Sumo de laranja

A ingestão diária sumo de laranja também tem sido considerada como uma possibilidade para reverter o fenótipo de MDR manifestado por diferentes tipos células tumorais aos fármacos anticancerígenos (IKEGAWA *et al.*, 2000). TAKANAGA e colaboradores (1999) investigaram a inibição da gp-P por constituintes do sumo de laranja. Os resultados conseguidos indicaram que os flavonóides heptametoxiflavona, tangeretina e nobelitina induziram a acumulação intracelular de vimblastina em células Caco-2, demonstrando potencial para a reversão da condição de MDR mediada pela gp-P (TAKANAGA *et al.*, 1999). IKEGAWA *et al.* (2000) também demonstraram que a dihidroxi-bergamotina e a bergamotina, outros constituintes do sumo de laranja, inibem o efluxo da vincristina mediado pela gp-P em células leucémicas humanas, resultando, conseqüentemente, na acumulação intracelular do fármaco (IKEGAWA *et al.*, 2000).

1.7.4.5.3. Outros constituintes fitoquímicos do género *Citrus*

A ingestão de citrinos parece ser benéfica na redução de certos tipos de cancro no homem (NABEKURA *et al.*, 2008). Os limonóides são metabolitos secundários derivados da limonina presente em várias espécies do género *Citrus*. Esta classe de metabolitos parece apresentar múltiplas propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo propriedades insecticidas, antimicrobianas, anticancerígenas, e antimaláricas, entre outras. Para além dos limonóides, também outros fitoquímicos de espécies do género *Citrus* demonstraram ter efeitos anticancerígenos, especialmente monoterpénos, flavonóides e cumarinas (EL-REDI *et al.*, 2010).

Em particular, a interferência com a gp-P de diversos constituintes fitoquímicos (aurapteno, nobiletina, citral, citronelal, limoneno, limonina e sinefrina) presentes em espécies do género *Citrus* foram investigados por NABEKURA e seus colaboradores (2008) em células KB-C2 de carcinoma cervical humano que sobreexpressam a gp-P. Os resultados obtidos demonstraram um aumento da acumulação intracelular de daunorrubicina na presença de aurapteno e nobiletina. Por outro lado, também a actividade ATPase da gp-P foi estimulada por estes compostos. Globalmente, estas observações sugerem que o aurapteno e a nobiletina presentes no género *Citrus* têm um efeito inibidor do transporte de efluxo mediado pela gp-P (NABEKURA *et al.*, 2008). Para além do aurapteno, outros flavonóides do género *Citrus* têm sido testados. A diosmina mostrou aumentar a acumulação intracelular de rodamina 123 e de digoxina (substratos da gp-P) em células Caco-2 (YOO *et al.*, 2007). Num estudo conduzido por MERTENS-TALCOTT *et al.* (2007) foi também avaliada a influência de flavonas polimetoxiladas (tangeretina, nobiletina, 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona e sinensetina) e de outros constituintes de género *Citrus* (limetina, 7-hidroxicumarina, 7-geraniloxicumarina e eriodictiol) no transporte do talinolol (substrato da gp-P) em monocamadas de células Caco-2. O transporte de efluxo do talinolol foi avaliado na ausência e na presença de diferentes concentrações de verapamil (controlo positivo para a inibição da gp-P). Os resultados obtidos indicaram uma redução do transporte de efluxo do talinolol pelas flavonas polimetoxiladas, com a tangeretina a apresentar uma maior potência inibitória (MERTENS-TALCOTT *et al.*, 2007). BAYET *et al.* (2007) também isolaram, identificaram e avaliaram múltiplos constituintes de raízes de *Citrus sinensis*: cinco cumarinas (clausarina, suberosina, poncitrina, xantiletina e tamnosmonina), sete acridonas (acrimarina B, 2-metoxicitpressina I, citpressina I,

buntanina, acrimarina E, honiumina e acrimarina C) e um terpenóide (a limonina). Entre estes compostos, a clausarina, a 2-metoxicitpressina I e a acrimarina E inibiram o efluxo de fármacos mediado pela gp-P em células leucémicas K562/R7 que sobreexpressam esta glicoproteína (BAYET *et al.*, 2007). EL-REDI *et al.* (2010) avaliaram o potencial de alguns metabolitos secundários do *Citrus jambhiri* e do *Citrus piriformis* para reverter a actividade da gp-P em células leucémicas humanas CEM/ADR5000 e em células Caco-2. Os resultados obtidos indicaram que a limonina é um inibidor potente da gp-P e potencia a citotoxicidade da doxorubicina nas duas linhas celulares usadas como modelos experimentais (EL-REDI *et al.*, 2010). Globalmente, os resultados de todos estes estudos suportam que constituintes fitoquímicos de espécies do género *Citrus* podem ser bons candidatos para o desenvolvimento de novos compostos capazes de promoverem a reversão da actividade de efluxo mediada pela gp-P, podendo contribuir para ultrapassar o fenótipo de MDR mediado por este transportador.

1.7.4.6. Outras espécies de plantas

Para além dos extractos ou constituintes fitoquímicos das espécies vegetais que acabámos de discutir, é de salientar, neste âmbito, que extractos ou constituintes de muitas outras espécies de plantas têm vindo a ser testados como potenciais inibidores da gp-P, embora de forma menos sistemática. Na tabela 1 estão sumariadas muitas destas espécies de plantas já avaliadas e os modelos experimentais usados (gp-P positivos). Da listagem apresentada é evidente a carência de estudos de inibição da gp-P realizados em modelos *in vivo*.

Tabela 1. Outras espécies de plantas cujos extractos mostraram inibir a actividade da glicoproteína-P (gp-P) em diferentes modelos experimentais que expressam naturalmente ou são induzidos a expressar a gp-P.

Espécies de plantas	Modelos experimentais	Referências bibliográficas
<i>Annickia kummeriae</i>	Células MCF-7 resistentes	OWUSU <i>et al.</i> , 2004
<i>Euphorbia lagascae</i>	Células L5178 de rato	FERREIRA <i>et al.</i> , 2006
<i>Euphorbia lathyris</i>	Células MCF-7 resistentes	JIAO <i>et al.</i> , 2009
<i>Euphorbia portlandica</i>	Células de linfoma de rato	MADUREIRA <i>et al.</i> , 2004
<i>Echinacea pallida</i>	Células HK-2	ROMITI <i>et al.</i> , 2008
<i>Echinacea purpurea</i>	Células Caco-2	HANSEN e NILSON, 2009
<i>Glycyrrhiza inflata</i>	Células de jejuno de rato	HUANG <i>et al.</i> , 2008
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Células HK-2	ROMITI <i>et al.</i> , 2009
<i>Haplophyllum perforatum</i>	Células MDCK-MDR1	LIM <i>et al.</i> , 2007
<i>Kaempferia parviflora</i>	Células LLC-GA5-COL150/MDR1	PATANASETHANONT <i>et al.</i> , 2007
<i>Mangifera indica</i>	Células HK-2 e Caco-2	CHIELI <i>et al.</i> , 2009
<i>Marsdenia tenacissima</i>	Células HepG2/DOX	HU <i>et al.</i> , 2008
<i>Cannabis sativa</i>	Células Caco-2 e LLC-PK1/MDR1	ZHU <i>et al.</i> , 2006
<i>Paris polyphyla</i>	Células K562/R7	NGUYEN <i>et al.</i> , 2009
<i>Pinus massoniana</i>	Células RBMECS Murganhos com cerebroma humano	HE <i>et al.</i> , 2009
<i>Piper Methysticum</i>	Células P388	WEISS <i>et al.</i> , 2005
<i>Phellodendron amurense</i>	Células MES-SA/DX5 e HCT15	MIN <i>et al.</i> , 2007
<i>Psidium guajva</i>	Células MES-SA/DX5 e HCT15 Íleo de rato	JUNYAPRASERT <i>et al.</i> , 2007
<i>Schisandra chinensis</i>	Células Caco-2 Células HepG2-DR	YOO <i>et al.</i> , 2007 FONG <i>et al.</i> , 2007
<i>Scutellaria barbata</i>	Células R-HepG2	TANG <i>et al.</i> , 2007
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Células Caco-2	LI <i>et al.</i> , 2008
<i>Zanthoxyli Fructus</i>	Células LLC-GA5-COL150/MDR1	YOSHIDA <i>et al.</i> , 2005
<i>Caulis mahoniae</i>	Células MCF7/DOX	WANG e YANG, 2008
<i>Rhodiola rosea</i>	Células Caco-2	HELLUM <i>et al.</i> , 2010
<i>Ginkgo biloba</i>	Células Bcap37/MDR1	WANG <i>et al.</i> , 2005

1.8. Modelos para identificar inibidores da glicoproteína-P candidatos a fármacos

As primeiras evidências relativas à reversão farmacológica do fenótipo de MDR induzida pela gp-P surgiram nos anos 80. Por essa altura, o verapamil (um bloqueador dos canais de cálcio) e a trifluoperazina (um antagonista da calmodulina) mostraram potenciar *in vitro e in vivo* a acumulação intracelular de vincristina em células leucémicas com MDR. Porém, estes fármacos não foram bem sucedidos em estudos posteriores (BANSAL *et al.*, 2009). Em resultado destas observações iniciais muitos esforços têm sido dedicados, quer pela indústria farmacêutica quer pela comunidade científica académica, à identificação de inibidores da gp-P capazes serem empregues na prática clínica para reverter a MDR, especialmente no tratamento de diferentes tipos de cancro. No entanto, decorridas quase quatro décadas desde a descoberta da glicoproteína ainda esperamos pela introdução na clínica do primeiro fármaco inibidor da gp-P com uma relação benefício-risco favorável. Consequentemente, persiste a necessidade de identificar e desenvolver compostos mais eficazes e seguros como inibidores da gp-P.

Tirando partido do conhecimento adquirido ao longo destes anos, no que respeita à caracterização estrutural da gp-P associado a dados crescentes de relação estrutura-actividade e ao aparecimento de ferramentas inovadoras de química combinatorial e de bioinformática (modelos *in silico*), têm sido implementados programas mais racionais de *design*, identificação e desenvolvimento de novos inibidores da gp-P candidatos a fármacos. Apesar de alguns avanços conseguidos, a verdade é que os resultados dos ensaios clínicos de fase III realizados com os inibidores da gp-P identificados mediante esta aproximação mais racional mostraram ser pouco animadores. Pois, desde logo, nenhum benefício significativo em termos de sobrevivência foi conseguido com a inibição da gp-P (BANSAL *et al.*, 2009). De facto, dada a ampla variedade de substratos e inibidores da gp-P, química e estruturalmente não relacionados, parece-nos que o uso destas ferramentas inovadoras seja, neste caso, menos promissor que perante outros alvos terapêuticos que apresentam maior especificidade. Talvez por isso, programas sistemáticos de *screening* empírico se justifiquem neste caso, recorrendo, a modelos experimentais *in vitro e in vivo* que expressem constitutivamente a gp-P ou neles seja induzida a expressão desta glicoproteína. Seguindo esta linha de raciocínio, os modelos experimentais *in vitro e*

in vivo continuarão, provavelmente, a apresentar-se como ferramentas essenciais para a identificação de potenciais inibidores da gp-P.

Entre os modelos *in vitro*, aqueles utilizados mais frequentemente são os ensaios baseados em células que expressam a gp-P de forma polarizada, de que são exemplo as linhas celulares Caco-2, MDCK ou LLC-PK1. Estas linhas celulares expressam a gp-P apenas na parte apical e podem ser cultivadas até à confluência em suportes apropriados, possibilitando a formação de monocamadas celulares que permitem avaliar o transporte e/ou acumulação de substratos da gp-P. Os compostos a testar como potenciais inibidores da gp-P, podem condicionar o transporte de marcadores da actividade da glicoproteína e o seu potencial poderá ser avaliado comparativamente a inibidores clássicos da gp-P, como por exemplo o verapamil (controlo positivo para a inibição) (ASZALOS, 2007).

No que se refere aos modelos *in vivo* usados para avaliar a inibição da gp-P, regra geral, são usados fundamentalmente após a realização de ensaios *in vitro* bem sucedidos. Neste tipo de modelos, essencialmente roedores (murganhos e ratos), é comum a avaliação da interferência dos compostos a testar como potenciais inibidores da gp-P no perfil cinético de substratos marcadores da actividade de efluxo mediada pela gp-P *versus* um controlo positivo para a inibição da gp-P (por exemplo, o verapamil). Entre os substratos sonda mais usados para avaliar a modulação actividade da gp-P estão a rodamina 123, um composto fluorescente e não tóxico, e a digoxina, embora muitos outros substratos da gp-P possam ser usados. Naturalmente, estes ensaios *in vivo* são realizados, primariamente, em roedores normais (*wild-type*) *mdr1* (+/+), ou seja, que expressam a gp-P em condições fisiológicas. Porém, em determinadas circunstâncias, nomeadamente para demonstrar a interferência específica na actividade da gp-P podem ser também realizados estudos considerando como modelo roedores *knockout* para a gp-P [*mdr1a* (-/-)] *versus* roedores *wild-type* (ASZALOS, 2007). Para além destes modelos experimentais, muitos outros podem ser usados para avaliar a modulação da actividade da gp-P, incluindo, por exemplo, modelos *ex vivo* envolvendo ensaios de transporte através de fatias de intestino delgado de roedores, órgão onde a gp-P é expressada constitutivamente (TAKEUCHI *et al.*, 2009).

Comum a todas estas aproximações para identificar potenciais inibidores da gp-P é a necessidade de se dispor de métodos bioanalíticos capazes de proporcionarem uma determinação quantitativa de substratos marcadores (sonda) da actividade de efluxo

da gp-P. Assim, a disponibilidade de métodos bioanalíticos suficientemente desenvolvidos e validados é um pré-requisito ao pretender-se iniciar programas sistemáticos para descoberta de novos inibidores da actividade da gp-P candidatos a fármacos.

2. OBJECTIVOS DA DISSERTAÇÃO

Embora se reconheça que diversos transportadores possam contribuir, pelos mecanismos de transporte transmembranar activo de efluxo que medeiam para o fenótipo de MDR, é hoje também aceite pela comunidade científica que a gp-P é o transportador de efluxo que mais contribui para a MDR. É por isso que, desde a década de 80, se têm tentado desenvolver estratégias direccionadas à inibição da actividade ou supressão da expressão da gp-P, tendo por objectivo reverter a MDR por ela mediada. Todavia, apesar da extensa investigação não-clínica e clínica conduzida neste âmbito, a verdade é que já passaram cerca de 30 anos desde a identificação dos primeiros inibidores da gp-P e ainda aguardamos pela introdução na clínica do primeiro fármaco efectivo como inibidor desta glicoproteína. No entanto, a consciencialização da evolução terapêutica que poderá representar o desenvolvimento de um fármaco inibidor da gp-P com uma relação benefício-risco favorável, particularmente no tratamento de diversos tipos de cancro que sobrexpressam a gp-P tem estimulado cada vez mais a investigação nesta área. Assim, com o intuito de se iniciar no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) da Universidade da Beira Interior e no seio do Grupo de Farmacométrie do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNBC) da Universidade de Coimbra uma linha de investigação conducente à procura de inibidores melhorados da gp-P candidatos a fármacos, considerou-se fundamental, como ponto de partida, o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico, simples e rápido, capaz de determinar quantitativamente um marcador (sonda) da actividade de efluxo da gp-P. Pois, a disponibilidade de um método bioanalítico com estas características é um pré-requisito ao iniciarem-se programas sistemáticos para descoberta de novos inibidores da gp-P candidatos a fármacos.

Concretamente, os objectivos traçados ao delinear o trabalho conducente a esta dissertação consistiram:

- No desenvolvimento e validação de um método fluorimétrico capaz de quantificar a rodamina 123 na matriz de plasma de rato. A rodamina 123, por ser um substrato clássico da gp-P, fluorescente e aparentemente não tóxico, foi o marcador

seleccionado com vista a avaliar a modulação da actividade funcional desta glicoproteína.

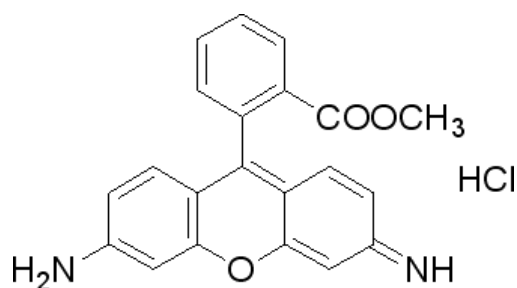
- Na demonstração da aplicação do método desenvolvido à quantificação da rodamina 123 em amostras reais provenientes de alguns ensaios *in vivo* conduzidos em ratos e destinados a avaliar o perfil cinético da rodamina 123 na ausência e na presença de um inibidor clássico da gp-P (o verapamil; controlo positivo para a inibição da actividade de efluxo da gp-P).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta secção descrevem-se as matérias-primas utilizadas e as metodologias experimentais empregues no desenvolvimento e validação do método fluorimétrico aqui proposto para a determinação quantitativa da rodamina 123 em plasma de rato. Descrevem-se também os ensaios experimentais executados para demonstrar a aplicação do método a amostras reais, em que se pretendeu confirmar a inibição da actividade da gp-P causada pelo verapamil (inibidor clássico da gp-P) usando a rodamina 123 como marcador da actividade de efluxo mediada pela gp-P.

3.1. Padrão de rodamina 123

O padrão usado no desenvolvimento e validação desta técnica bioanalítica foi a rodamina 123 (substrato marcador da actividade da gp-P), a qual foi adquirida à Sigma (St. Louis, MO, USA; referência: 62669-70-9). A estrutura química correspondente está representada na figura 6.



Rodamina 123

Figura 6. Estrutura química da rodamina 123 [éster metílico do ácido 2-(6-amino-3-imino-3H-xanteno-9-il) benzóico; fórmula molecular: $C_{21}H_{17}ClN_2O_3$; peso molecular: 380,83].

3.2. Matriz biológica

A matriz de plasma branco de rato, isenta do analito de interesse (rodamina 123), usada durante os ensaios de desenvolvimento e validação do método fluorimétrico apresentado foi obtida a partir de ratos Wistar, machos e adultos (280–360 g), com origem na Harlan Interfauna (Barcelona, Espanha) e criados no biotério local. Durante todo o período de alojamento os ratos tiveram livre acesso a água e a dieta padronizada para roedores (4RF21, Mucedola, Itália) e foram mantidos em condições controladas de ventilação, temperatura e humidade. As amostras de sangue foram recolhidas para tubos heparinizados, após deslocamento cervical e imediata decapitação. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 min (4 °C) e o plasma foi separado e armazenado a -80 °C. Todos os procedimentos de experimentação animal foram realizados em conformidade com a Directiva Europeia (86/609/EEC) para a protecção dos animais utilizados para fins experimentais ou outros fins científicos.

3.3. Solução *stock*, padrões de calibração e amostras de controlo de qualidade

A solução *stock* de rodamina 123 (1 mg/mL) foi preparada por dissolução de uma quantidade apropriada deste composto em metanol. Posteriormente, a partir da solução *stock*, prepararam-se três soluções a 20 µg/mL, 100 µg/mL e 400 µg/mL por diluição apropriada com metanol. Estas soluções diluídas foram usadas para a preparação de sete soluções de fortificação (SF_{P1}, SF_{P2}, SF_{P3}, SF_{P4}, SF_{P5}, SF_{P6} e SF_{P7}) com as concentrações finais respectivas de 0,4 µg/mL, 0,8 µg/mL, 2 µg/mL, 4,5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL usadas na preparação dos padrões de calibração. Os padrões de calibração (P₁, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆ e P₇) foram preparados nas concentrações de 0,04 µg/mL, 0,08 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,45 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL e 4 µg/mL mediante a adição de 20 µL das respectivas soluções de fortificação a 180 µL de plasma branco de rato. Amostras de controlo de qualidade (CQ) também foram preparadas, independentemente, em plasma branco de rato nas concentrações de 0,04 µg/mL (CQ_{LQ}, representativa do limite de quantificação), de 0,1 µg/mL (CQ₁, representativa da zona baixa da gama de calibração), de 1,8 µg/mL (CQ₂, representativa da zona média da gama de calibração), e de 3,6 µg/mL (CQ₃, representativa da zona alta da gama de

calibração). Todas as soluções de fortificação, quer dos padrões de calibração quer das amostras CQ foram armazenadas a aproximadamente 4 °C, protegidas da luz, durante 15 dias.

3.4. Preparação das amostras

O procedimento de preparação das amostras de plasma consistiu num passo único de precipitação das proteínas com acetonitrilo. A cada alíquota (200 µL) de plasma foi adicionado um volume igual de acetonitrilo (reagente de precipitação). A mistura obtida foi agitada no vórtex durante cerca de 10 s e centrifugada de seguida a 17000 rpm durante 20 min (4 °C). Posteriormente, uma alíquota (200 µL) do sobrenadante claro de cada amostra foi transferida para um poço de uma microplaca de 96 poços e as concentrações de rodamina 123 presentes determinadas por fluorimetria. Notar que todo o procedimento de preparação das amostras decorreu numa sala com reduzida luminosidade para minimizar a eventual degradação pela luz do fluorocromo (rodamina 123).

3.5. Espectrofluorímetro e condições de detecção seleccionadas

As análises fluorimétricas realizadas durante o processo de desenvolvimento e validação do método bioanalítico considerado foram efectuadas num espectrofluorímetro Fluoromax-4[®] (Horiba Jobin Yvon) equipado com uma lâmpada de xenon e acoplado a um leitor de microplacas MicroMax-384[®] que permite a leitura rápida de microplacas de 96 (12 x 8) ou 384 (24 x 16) poços. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente em microplacas de 96 poços e a intensidade de fluorescência da rodamina 123 foi avaliada a 575 nm (comprimento de onda de emissão), usando um comprimento de onda de excitação de 480 nm. O sistema foi controlado pelo software FluorEssence[™].

3.6. Validação do método

Uma vez que não existem recomendações claras a aplicar na validação de métodos bioanalíticos de fluorimetria, na validação do método fluorimétrico que aqui se descreve para determinar quantitativamente a rodamina 123 em plasma de rato foram consideradas, sempre que possível, as recomendações internacionais relativas à validação de métodos bioanalíticos cromatográficos destinados a estudos farmacocinéticos de natureza não-clínica e clínica (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). Neste contexto, os parâmetros de fiabilidade estudados na validação deste método fluorimétrico foram a selectividade, a curva de calibração e o limite de quantificação, a precisão e a exactidão, a recuperação e a estabilidade da rodamina 123 em plasma de rato.

3.6.1. Selectividade

A selectividade do método é a capacidade para quantificar a rodamina 123 na presença de outros componentes da amostra, os quais podem compreender substâncias endógenas da própria matriz biológica, metabolitos, produtos de degradação, impurezas e fármacos administrados concomitantemente (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). Neste caso, este parâmetro foi avaliado assumindo que pequenas interferências na quantificação da rodamina 123 são aceites, desde que a precisão e a exactidão permaneçam em limites aceitáveis (PETERS e MAURER, 2002).

A selectividade do método foi estudada, atendendo, por um lado, à interferência com a intensidade de fluorescência da rodamina 123 por parte de substâncias endógenas presentes na matriz de plasma de rato e, por outro lado, de substâncias presentes provavelmente em amostras reais provenientes de estudos *in vivo* de inibição da actividade da gp-P: [heparina (anticoagulante), solução carboximetilcelulose 0,5% (veículo usado frequentemente na administração oral de fármacos ou potenciais inibidores da gp-P) e verapamil (um inibidor clássico da gp-P usado como controlo positivo de inibição)]. Para avaliar a interferência das substâncias endógenas da matriz de plasma rato, amostras de plasma branco provenientes de seis animais diferentes foram fortificadas com rodamina 123, na concentração correspondente ao limite de

quantificação (0,04 µg/mL), tratadas e analisadas, e a intensidade de fluorescência obtida (n = 6) foi comparada com a intensidade de fluorescência produzida por soluções aquosas de rodamina 123 na mesma concentração (0,04 µg/mL) e sujeitas aos mesmos tratamentos (n = 6). Da mesma forma, a resposta obtida a partir de amostras de plasma branco fortificadas com rodamina 123 (0,04 µg/mL; n = 6) e com 20 µL de heparina, ou da solução aquosa de carboximetilcelulose a 0,5% (m/v), ou da suspensão de verapamil (2,5 mg/mL) em carboximetilcelulose, foi comparada com a resposta de soluções aquosas de rodamina 123 na mesma concentração e sujeitas aos mesmos procedimentos (n = 6); em presença das possíveis interferências (endógenas e exógenas) um coeficiente de variação (CV) na intensidade de fluorescência da rodamina 123 inferior ou igual a 20% e um desvio (*bias*) que não exceda $\pm 20\%$ em relação à intensidade de fluorescência produzida pelas soluções aquosas de rodamina 123 na mesma concentração foram definidos como indicadores da selectividade do método.

Pretendendo-se que este método possa servir de suporte a um programa alargado de identificação de potenciais inibidores da gp-P seria, obviamente, impossível testar todos os eventuais interferentes químicos e/ou fitoquímicos que venham a ser avaliados como inibidores da gp-P. Portanto, sempre que se pretenda aplicar este método bioanalítico para avaliar a modulação da actividade da gp-P *in vivo* em ratos por extractos de plantas, fitoquímicos isolados, fármacos ou outros compostos, é recomendado testar-se sempre a selectividade do método perante essas novas substâncias antes de se avançar com os ensaios *in vivo*.

3.6.2. Curva de calibração e limite de quantificação

A curva de calibração é a relação existente entre a concentração do analito e a resposta e, obviamente, deve ser estabelecida recorrendo a um número suficiente de padrões de calibração preparados na matriz biológica branca fortificada com concentrações conhecidas do analito, as quais devem abranger toda a gama de concentrações esperada. Porém, não há recomendações claras quanto ao número de níveis de concentração a estudar nem quanto ao número de replicados a analisar por nível de concentração. SHAH *et al.* (2000) referem que a curva de calibração deve ser estabelecida com um mínimo de 5 padrões de calibração, excluindo os brancos da

amostra, e recorrendo ao modelo mais simples que defina adequadamente a relação concentração-resposta (SHAH *et al.*, 2000).

Para estudar a linearidade do método fluorimétrico na determinação da rodamina 123 foram construídas curvas de calibração em seis dias diferentes ($n = 6$), com sete padrões de calibração preparados em plasma branco de rato, na gama de concentração 0,04-4 $\mu\text{g/mL}$. As curvas de calibração foram traçadas considerando a relação da intensidade de fluorescência (IF) da rodamina 123 *versus* a concentração de rodamina 123 (C) adicionada. Os dados foram sujeitos à análise de regressão linear simples ($IF = aC + b$) e a curva de calibração repetida aquando da obtenção de um coeficiente de regressão linear inferior a 0,995. A qualidade da curva de calibração foi assegurada por desvios em relação à concentração nominal que não excedessem 15% ou 20% no limite de quantificação (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

O limite de quantificação do método fluorimétrico para a rodamina 123 foi estabelecido como a concentração mais baixa da curva de calibração capaz de ser medida com precisão (CV inferior ou igual a 20%) e exactidão (*bias* que não exceda $\pm 20\%$] aceitáveis. O limite de quantificação foi avaliado pela análise em replicado ($n = 6$), intra e interdia, de amostras de plasma fortificadas com rodamina 123 na concentração mais baixa da gama de calibração (0,04 $\mu\text{g/mL}$; C_{QLQ}).

3.6.3. Precisão e exactidão

A precisão e a exactidão de um método bioanalítico, na determinação de concentrações conhecidas do analito na matriz biológica, têm que ser demonstradas durante o processo de validação (SHAH *et al.*, 2000). De facto, a precisão e a exactidão determinam conjuntamente o erro dos resultados analíticos e são o critério primário ao avaliar a capacidade de um método (BRESSOLLE *et al.*, 1996).

A precisão descreve o grau de concordância entre as determinações individuais de um analito quando um procedimento é aplicado repetidamente a alíquotas de uma amostra homogénea (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). Este parâmetro pode ser considerado em três categorias: repetibilidade (precisão intradia), precisão intermédia (precisão interdia) e reprodutibilidade (precisão entre laboratórios)

(GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001; PETERS e MAURER, 2002). A precisão reflecte a distribuição dos resultados analíticos em redor do valor médio correspondente e é avaliada pela percentagem do CV [$CV (\%) = (\text{desvio padrão}/\text{média}) \times 100$] (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

A exactidão descreve o grau de proximidade entre os resultados médios proporcionados pelo método analítico e o valor verdadeiro do analito presente na amostra. Este parâmetro pode ser estudado pela análise de amostras com concentrações conhecidas e por comparação da concentração média das determinações efectuadas com a concentração teórica ou nominal (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). A exactidão é vulgarmente avaliada intra e interdia e é expressa pela percentagem do *bias*, desvio em relação ao valor de referência { $bias (\%) = [(C_{\text{média}} - C_{\text{nominal}}) / C_{\text{nominal}}] \times 100$ }.

A precisão e a exactidão podem ser estimadas a partir dos dados analíticos resultantes da análise em replicado de amostras de CQ. Para aplicações bioanalíticas é recomendado que a precisão e a exactidão sejam estudadas em, pelo menos, 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta) representativas da gama de concentrações esperada, recorrendo a um mínimo de 5 determinações por nível de concentração. A precisão não deve exceder 15% de CV, ou 20% no limite de quantificação. Relativamente à exactidão, o valor médio deve estar compreendido em $\pm 15\%$ do valor nominal, ou $\pm 20\%$ no limite de quantificação (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

A precisão e a exactidão dos resultados foram avaliadas, intra e interdia, em replicado ($n = 6$), através dos dados obtidos com amostras de CQ preparadas em plasma de rato, em três concentrações diferentes representativas da gama de calibração considerada. As concentrações testadas foram 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (CQ₁, representativa da zona baixa da gama de calibração), 1,8 $\mu\text{g/mL}$ (CQ₂, representativa da zona média da gama de calibração) e 3,6 $\mu\text{g/mL}$ (CQ₃, representativa da zona alta da gama de calibração). Concretamente, para estas concentrações, o critério de aceitação para a precisão estabelecido foi um valor de CV que não exceda 15% e para a exactidão um valor de *bias* dentro de $\pm 15\%$.

3.6.4. Recuperação

A recuperação de um analito é um indicador da eficiência de extracção do processo analítico, a qual é referida como a percentagem da resposta do analito após a extracção da matriz biológica comparativamente àquela obtida a partir de uma solução (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). As amostras biológicas, pela sua composição intrínseca, muitas vezes não podem ser analisadas directamente, devendo ser previamente submetidas a processos de preparação mais ou menos complexos, para eliminar possíveis substâncias interferentes e extrair os analitos em condições adequadas à análise instrumental. Todas estas etapas de pré-tratamento das amostras conduzem, inevitavelmente, a perdas nos analitos, sendo importante estimar a capacidade de recuperação destes a partir da matriz biológica. A recuperação não necessita de ser 100%, mas a extensão em que ocorre deve ser consistente, precisa e reprodutível. A recuperação deve ser estudada em replicado e em pelo menos 3 concentrações diferentes (baixa, média e alta) representativas da gama de concentrações esperada (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

A recuperação da rodamina 123 a partir das amostras de plasma de rato foi estudada, através de análises, em replicado ($n = 6$), nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (CQ₁, representativa da zona baixa da gama de calibração), 1,8 $\mu\text{g/mL}$ (CQ₂, representativa da zona média da gama de calibração) e 3,6 $\mu\text{g/mL}$ (CQ₃, representativa da zona alta da gama de calibração). A recuperação da rodamina 123 a partir das amostras de plasma de rato foi estimada comparando a intensidade de fluorescência da rodamina 123 obtida a partir de amostras de plasma fortificadas e processadas *versus* a intensidade de fluorescência obtida a partir de soluções aquosas fortificadas às mesmas concentrações e sujeitas ao mesmo processamento (representam 100% de recuperação).

3.6.5. Estabilidade na matriz biológica

A estabilidade do analito nas matrizes biológicas depende das condições de armazenamento, do sistema de acondicionamento, das propriedades químicas da substância, do tipo de matriz e até da espécie animal (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). Um pré-requisito fundamental para garantir que os resultados quantitativos obtidos são

fidedignos é a estabilidade do analito ao longo de todo o procedimento bioanalítico. Como a degradação dos analitos é susceptível de ocorrer nas matrizes biológicas, é importante documentar a estabilidade destes entre a colheita e a análise das amostras. Assim, no processo de validação de um método analítico devem ser incluídos ensaios de estabilidade na matriz biológica nas condições típicas de processamento e armazenamento das amostras (PETERS e MAURER, 2002).

A estabilidade do analito na matriz biológica é testada por comparação dos resultados obtidos em amostras de CQ, analisadas antes (amostras de referência) e depois de serem submetidas às condições dos ensaios de estabilidade (amostras de estabilidade). Os estudos de estabilidade devem ser executados no mínimo em dois níveis de concentração (baixo e alto) representativos da gama de calibração e, pelo menos, em triplicado (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001).

A estabilidade da rodamina 123 foi avaliada em plasma de rato, mediante a análise, em replicado ($n = 6$), de amostras de CQ nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (CQ₁, representativa da zona baixa da gama de calibração) e 3,6 $\mu\text{g/mL}$ (CQ₃, representativa da zona alta da gama de calibração). A estabilidade foi estudada durante 2 h à temperatura ambiente, 4 h a 4 °C e durante 5 dias a -80 °C, simulando as condições de manipulação e de armazenamento das amostras que antecedem a análise. A estabilidade foi estimada por comparação dos dados obtidos a partir das amostras de CQ analisadas antes (amostras de referência) e depois (amostras de estabilidade) de expostas às condições de estabilidade previamente mencionadas. Como critério de estabilidade estabeleceu-se que a diferença em percentagem entre os dados resultantes das amostras de estabilidade e de referência deve estar compreendida em $\pm 15\%$.

3.6.6. Aplicação do método e farmacocinética da rodamina 123

A aplicação do método fluorimétrico desenvolvido e validado para a quantificação da rodamina 123 em amostras reais de plasma de rato foi demonstrada, mediante a confirmação *in vivo* da inibição da actividade da gp-P mediada pelo verapamil (controlo positivo para a inibição da gp-P), ou seja, avaliou-se o perfil farmacocinético da rodamina 123 (substrato clássico da gp-P) quando administrada por

via intravenosa em ratos Wistar, na ausência e na presença de pré-tratamento com verapamil.

Para tal, 10 ratos Wistar, machos e adultos (280-360 g) foram divididos em dois grupos de cinco animais cada ($n = 5$). Na véspera das experiências os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina/clorpromazina e foi-lhes introduzido um cateter intravenoso periférico (22 G; Introcan[®] Safety, B. Braun) na veia lateral da cauda de forma a permitir a administração intravenosa da rodamina 123 e a colheita subsequente de amostras de sangue ao longo do tempo. Durante a noite os ratos recuperaram da anestesia e foram mantidos em jejum, tendo livre acesso apenas à água.

Para avaliar a interferência do verapamil com a actividade da gp-P, os ratos foram sujeitos 2 h antes da administração intravenosa de rodamina 123 aos seguintes pré-tratamentos por via oral (*gavage*): Grupo I (veículo, solução de carboximetilcelulose a 0,5%; controlo) e Grupo II (25 mg/kg de verapamil em carboximetilcelulose a 0,5%; controlo positivo para a inibição da gp-P). Duas horas após os tratamentos indicados procedeu-se então à administração intravenosa em bólus de uma dose de rodamina 123 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) a cada um dos animais dos diferentes grupos através do cateter implantado na cauda, seguindo-se, de imediato, a administração adicional de um bólus intravenoso (300 μL) de soro fisiológico a 0,9% para permitir que toda a rodamina 123 previamente administrada entrasse na circulação sanguínea, minimizando assim a retenção de resíduos de rodamina 123 no cateter. Para caracterizar o perfil cinético da rodamina 123, nas diferentes condições experimentais, procedeu-se à colheita de amostras de sangue ($\sim 400 \mu\text{L}$) em cada um dos animais aos seguintes tempos: 0,083 (5 min), 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 e 10 h após a administração da rodamina 123. Salientar também que se procedeu à colheita de uma amostra de sangue 15 min antes da administração de rodamina 123; esta colheita teve por objectivo investigar a interferência potencial de metabolitos do veículo ou do verapamil gerados *in vivo* na quantificação da rodamina 123 (esta amostra constitui mais um teste à selectividade do método). As amostras de sangue foram recolhidas para tubos heparinizados e de imediato colocadas em gelo em ambiente escuro e, logo que possível, centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min (4 °C). O plasma (sobrenadante) foi separado e armazenado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até à análise fluorimétrica das concentrações de rodamina 123. No final da experiência os animais foram sacrificados. A experimentação animal foi conduzida em conformidade com a Directiva Europeia (86/609/EEC) para a protecção dos animais utilizados para fins experimentais ou outros fins científicos.

Os perfis plasmáticos médios concentração-tempo obtidos para a rodamina 123 nas diferentes condições experimentais (presença e ausência de pré-tratamento com verapamil) foram sujeitos a uma análise farmacocinética não-compartimental a fim de obter os principais parâmetros farmacocinéticos de interesse neste contexto, ou seja, os parâmetros farmacocinéticos que melhor traduzem a extensão de exposição sistémica à rodamina 123: a área sob a curva concentração-tempo (*area under the curve*, AUC) desde o tempo zero até ao último tempo (t) de amostragem com concentração igual ou superior ao limite de quantificação do método (AUC_{0-t}) e a AUC desde o tempo zero até ao infinito ($AUC_{0-\infty}$). A análise farmacocinética foi realizada recorrendo ao *software* WINNONLIN[®] versão 1.1 (Pharsight Co, Mountain View, CA, USA). Os parâmetros farmacocinéticos estimados para a rodamina 123, característicos dos perfis plasmáticos médios concentração-tempo obtidos mediante os diferentes tratamentos, foram comparados como objectivo de inferir acerca da inibição da actividade da gp-P mediada pelo verapamil.

4. RESULTADOS

Nesta secção apresentam-se os resultados decorrentes da validação do método fluorimétrico descrito para a determinação quantitativa da rodamina 123 em plasma de rato. Por outro lado, apresentam-se também os resultados obtidos nos ensaios experimentais executados para demonstrar a aplicação do método à quantificação da rodamina 123 a partir de amostras reais de plasma de rato.

4.1. Validação do método fluorimétrico para determinação da rodamina 123

4.1.1. Selectividade

A selectividade do método fluorimétrico para a determinação quantitativa da rodamina 123 foi demonstrada no limite de quantificação (0,04 µg/mL) em relação às interferências endógenas da própria matriz de plasma de rato e em relação aos compostos exógenos testados (heparina, solução de carboximetilcelulose e verapamil em carboximetilcelulose). Pois, a intensidade de fluorescência foi consistente (CV ≤17,8%) nas amostras de plasma branco fortificadas com rodamina 123 e nas amostras de plasma fortificadas com rodamina 123 mais heparina, rodamina 123 mais carboximetilcelulose e rodamina 123 mais verapamil em carboximetilcelulose. Por outro lado, a intensidade de fluorescência proporcionada pela rodamina 123 nestas amostras não diferiu significativamente (*bias* variou de -15,1% a 18,1%) da intensidade de fluorescência da rodamina 123 em soluções aquosas sujeitas aos mesmos tratamentos (Tabela 2). No entanto, sempre que estejam em causa estudos que envolvam potenciais interferentes para além dos testados aqui, recomenda-se que a selectividade do método seja verificada perante essas novas substâncias antes da sua aplicação.

Tabela 2. Variabilidade da intensidade de fluorescência (CV %) e interferência (*bias* %) de substâncias (endógenas à matriz de plasma de rato e exógenas) na intensidade de fluorescência da rodamina 123 na concentração correspondente ao limite de quantificação (0,04 µg/mL) (n = 6).

Interferentes	CV (%)	Bias[#] (%)
Plasma branco	13,3	8,3
Plasma branco/heparina	9,5	15,1
Plasma branco/carboximetilcelulose	14,5	9,3
Plasma branco/verapamil em carboximetilcelulose	17,8	-10,3

[#] Em relação à intensidade de fluorescência da rodamina 123 em soluções aquosas fortificadas na concentração de 0,04 µg/mL (n = 6) e sujeitas aos mesmo procedimentos.

4.1.2. Curva de calibração e limite de quantificação

As curvas de calibração obtidas em plasma de rato ao longo de 6 dias (n = 6) demonstraram linearidade para a rodamina 123 na gama de concentrações de 0,04-4 µg/mL. As equações e o coeficiente de regressão (r^2) das curvas de calibração obtidas são apresentados na tabela 3. Os resultados suportam uma boa linearidade entre a intensidade de fluorescência da rodamina 123 e a respectiva concentração, sendo a recta média obtida a seguinte: $IF = 1,917 \times 10^6 C + 1,797 \times 10^5$ ($r^2 \geq 0,9995$).

Tabela 3. Curvas de calibração para a rodamina 123 em plasma de rato (n = 6).

Fármaco	Padrões calibração (µg/mL)	Equação de regressão^a	r^2
Rodamina 123 (Dia 1)	0,04; 0,08; 0,2; 0,45; 1; 2; 4	$IF = 1,928 \times 10^6 C + 1,766 \times 10^5$	0,9997
Rodamina 123 (Dia 2)	0,04; 0,08; 0,2; 0,45; 1; 2; 4	$IF = 1,836 \times 10^6 C + 2,378 \times 10^5$	0,9999
Rodamina 123 (Dia 3)	0,04; 0,08; 0,2; 0,45; 1; 2; 4	$IF = 1,957 \times 10^6 C + 2,000 \times 10^5$	0,9991
Rodamina 123 (Dia 4)	0,04; 0,08; 0,2; 0,45; 1; 2; 4	$IF = 1,950 \times 10^6 C + 1,798 \times 10^5$	0,9988
Rodamina 123 (Dia 5)	0,04; 0,08; 0,2; 0,45; 1; 2; 4	$IF = 1,879 \times 10^6 C + 2,217 \times 10^5$	0,9995
Rodamina 123 (Dia 6)	0,04; 0,08; 0,2; 0,45; 1; 2; 4	$IF = 1,951 \times 10^6 C + 1,797 \times 10^5$	0,9998
Recta Média		$IF = 1,917 \times 10^6 C + 1,797 \times 10^5$	0,9995

^a $IF = bC + a$, em que C é a concentração de rodamina 123, expressa em (µg/mL), e IF é a intensidade de fluorescência, expressa em contagens por minuto (CPS), b é o declive e a é a intersecção na origem.; r^2 , coeficiente de regressão.

O limite de quantificação do método foi estabelecido em 0,04 µg/mL para a rodamina 123, pois esta é a concentração mais baixa da gama de calibração considerada e quantificada intra e interdia (n = 6) com precisão e exactidão aceitáveis (Tabela 4).

Tabela 4. Precisão (CV %) e exactidão (*bias* %) para a determinação da rodamina 123 em plasma de rato na concentração correspondente ao limite de quantificação (n = 6).

Fármaco/Concentração nominal (µg/mL)		Concentração experimental (Média ± DP, µg/mL)	CV (%)	Bias (%)
<i>Intradia</i>				
Rodamina 123	0,04	0,045 ± 0,014	10,4	-13,6
<i>Interdia</i>				
Rodamina 123	0,04	0,035 ± 0,012	8,96	12,1

DP, Desvio padrão.

4.1.3. Precisão e exactidão

Os resultados da precisão e exactidão do método analítico obtidos intra e interdia com a análise de amostras de CQ preparadas em plasma de rato estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5. Precisão (CV %) e exactidão (*bias* %) na determinação da rodamina 123 em plasma de rato nas concentrações de 0,1 µg/mL (CQ₁), 1,8 µg/mL (CQ₂) e 3,6 µg/mL (CQ₃) (n = 6).

Fármaco/Concentração nominal (µg/mL)		Concentração experimental (Média ± DP, µg/mL)	CV (%)	Bias (%)
<i>Intradia</i>				
Rodamina 123	0,1	0,094 ± 0,013	7,1	5,7
Rodamina 123	1,8	1,910 ± 0,187	9,3	-6,1
Rodamina 123	3,6	3,910 ± 0,113	2,8	-8,6
<i>Interdia</i>				
Rodamina 123	0,1	0,090 ± 0,015	7,8	9,7
Rodamina 123	1,8	2,009 ± 0,119	5,7	-11,6
Rodamina 123	3,6	3,931 ± 0,092	2,3	-9,2

DP, Desvio padrão.

Atendendo à globalidade dos dados analíticos, intra e interdia, o valor do CV foi $\leq 9,3\%$ e o *bias* variou entre $-11,6\%$ e $9,7\%$. Estes resultados indicam que a técnica desenvolvida é precisa e exacta para a determinação quantitativa da rodamina 123 em plasma de rato, pois os limites aceitáveis para a precisão e exactidão são cumpridos.

4.1.4. Recuperação

A recuperação da rodamina 123 a partir da matriz de plasma de rato foi estimada e os resultados obtidos apresentam-se na tabela 6. A análise dos dados revela que a recuperação média da rodamina 123 é elevada e variou de $89,0\%$ a $95,9\%$.

Tabela 6. Recuperação (%) da rodamina 123 a partir de plasma de rato nas concentrações de $0,1 \mu\text{g/mL}$ (CQ₁), $1,8 \mu\text{g/mL}$ (CQ₂) e $3,6 \mu\text{g/mL}$ (CQ₃) (n = 6).

Fármaco/Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação média (%)
Rodamina 123	0,1	89,0%
Rodamina 123	1,8	91,3%
Rodamina 123	3,6	95,9%

4.1.5. Estabilidade da rodamina 123 na matriz biológica

Pode constatar-se, a partir dos dados de estabilidade obtidos, que não foi observada qualquer degradação significativa da rodamina 123 em plasma de rato quando amostras fortificadas foram mantidas durante 2 h à temperatura ambiente, 4 h a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ou durante 5 dias a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ (Tabela 7). Notar que durante todo o período de armazenamento as amostras foram mantidas no escuro. Assim, a rodamina 123 é estável na matriz de plasma de rato nas condições estudadas, as quais simulam as condições de manipulação e de armazenamento das amostras que antecedem a análise fluorimétrica.

Tabela 7. Estabilidade (valores em %) da rodamina 123 em plasma de rato nas concentrações de 0,1 µg/mL (CQ₁) e 3,6 µg/mL (CQ₃) (n = 6).

Ensaio de estabilidade da rodamina 123	Concentração nominal (µg/mL)	
	0,1	3,6
Temperatura ambiente (2 h)	87,9%	89,1%
4 °C (4 h)	91,3%	96,2%
-80 °C (5 dias)	97,2%	98,5%

4.2. Aplicação do método e farmacocinética da rodamina 123 no rato

4.2.1. Perfil plasmático da rodamina 123 na ausência de verapamil

As concentrações plasmáticas de rodamina 123 foram avaliadas, durante um período de 10 h, após a administração em bólus intravenoso de uma dose única de 500 µg/kg de rodamina 123 a ratos Wistar pré-tratados oralmente, 2 horas antes da administração de rodamina 123, com uma solução de aquosa de carboximetilcelulose (veículo). As concentrações plasmáticas de rodamina 123 foram determinadas mediante a aplicação do método fluorimétrico desenvolvido e são apresentadas na tabela 8. Na figura 7 estão representados os perfis plasmáticos médios concentração-tempo obtidos para a rodamina 123 nas condições experimentais indicadas (na ausência de pré-tratamento com verapamil, inibidor clássico da gp-P).

Tabela 8. Concentrações plasmáticas de rodamina 123 após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 µg/kg a ratos Wistar pré-tratados com carboximetilcelulose (n = 5).

Tempo (h)	Ratos					Média ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5			
0,083	2,592	2,813	3,067	2,559	1,915	2,589	0,428	16,5
0,250	0,750	0,958	3,491	2,432	0,913	1,709	1,206	70,6
0,500	0,392	0,215	0,962	1,029	0,482	0,606	0,369	60,8
1,00	0,260	0,298	2,038	0,650	0,133	0,676	0,785	116,2
2,00	0,245	0,062	0,937	0,396	0,076	0,343	0,359	104,6
4,00	0,179	0,141	0,679	0,079	0,040	0,224	0,260	116,4
6,00	0,434	0,042	0,684	0,213	0,052	0,285	0,274	96,0
10,0	0,091	0,054	0,455	0,101	0,040	0,148	0,173	117,0

^a Média, µg/mL; ^b Desvio padrão; ^c Coeficiente de variação, %.

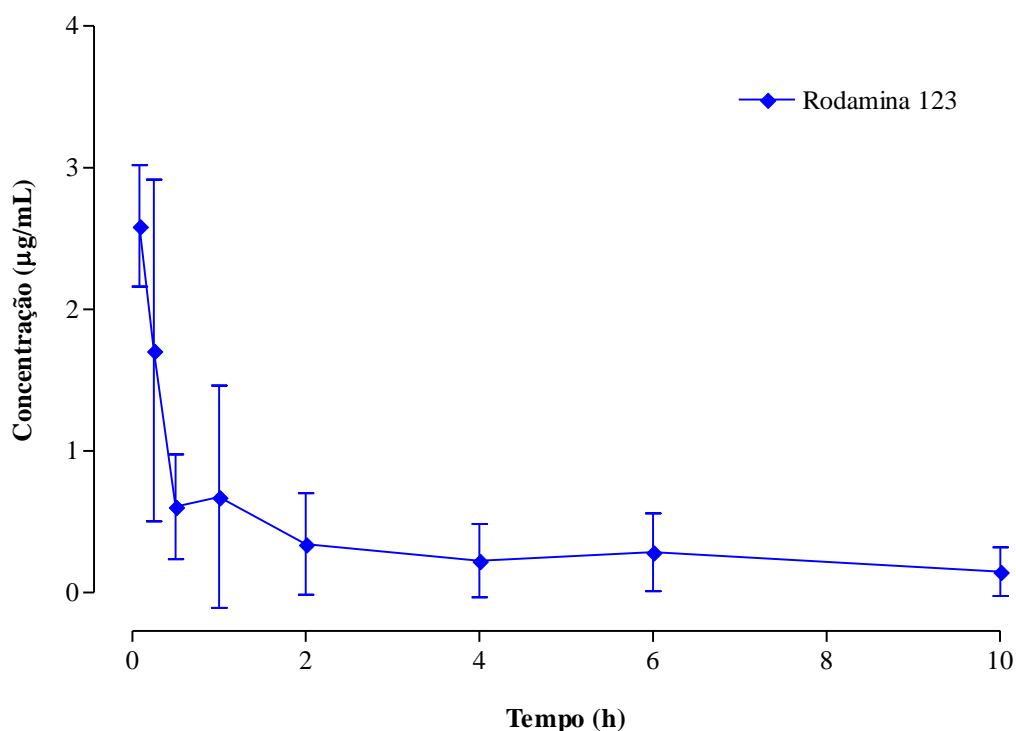


Figura 7. Perfis plasmáticos concentração-tempo obtidos para a rodamina 123 em ratos Wistar, pré-tratados com carboximetilcelulose, após a administração intravenosa em bólus de uma dose

única de 500 µg/kg de rodamina 123. Os símbolos representam a média±desvio padrão de 5 determinações por ponto do tempo (n = 5).

Tal como indicado no protocolo, 15 min antes da administração de rodamina 123, ou seja, 1,45 h após o pré-tratamento oral com a solução aquosa de carboximetilcelulose foi colhida uma amostra de sangue de cada um dos animais para garantir a selectividade do método perante eventuais metabolitos gerados *in vivo*. A análise dessas amostras indicou uma intensidade de fluorescência correspondente a concentrações muito inferiores ao limite de quantificação do método, reforçando a selectividade do método para a determinação da rodamina 123 em plasma de rato.

4.2.2. Perfil plasmático da rodamina 123 na presença de verapamil

As concentrações plasmáticas de rodamina 123 foram avaliadas, durante um período de 10 h, após a administração em bólus intravenoso de uma dose única de 500 µg/kg de rodamina 123 a ratos Wistar pré-tratados oralmente, 2 horas antes da administração de rodamina 123, com uma dose única de verapamil (25 mg/kg) em carboximetilcelulose (veículo). As concentrações plasmáticas de rodamina 123 determinadas apresentam-se na tabela 9. Na figura 8 estão representados os perfis plasmáticos médios concentração-tempo obtidos para a rodamina 123 nas condições experimentais indicadas (na presença de pré-tratamento com verapamil, inibidor clássico da gp-P).

Tabela 9. Concentrações plasmáticas de rodamina 123 após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 µg/kg a ratos Wistar pré-tratados com verapamil em carboximetilcelulose (n = 5).

Tempo (h)	Ratos					Média ^a	DP ^b	CV ^c
	1	2	3	4	5			
0,083	2,318	3,016	3,195	3,069	3,497	3,019	0,434	14,4
0,250	2,393	2,551	2,959	3,463	3,296	2,932	0,461	15,7
0,500	0,770	0,609	1,551	1,961	1,149	1,208	0,556	46,1
1,00	0,581	0,336	0,449	0,582	1,289	0,647	0,373	57,6
2,00	0,822	0,598	2,051	1,237	1,858	1,313	0,633	48,2
4,00	0,968	0,678	0,210	1,334	0,661	0,770	0,416	54,0
6,00	0,118	0,157	0,637	0,661	0,294	0,373	0,260	69,6
10,0	0,062	0,067	0,089	0,078	0,053	0,070	0,014	20,1

^a Média, µg/mL; ^b Desvio padrão; ^c Coeficiente de variação, %.

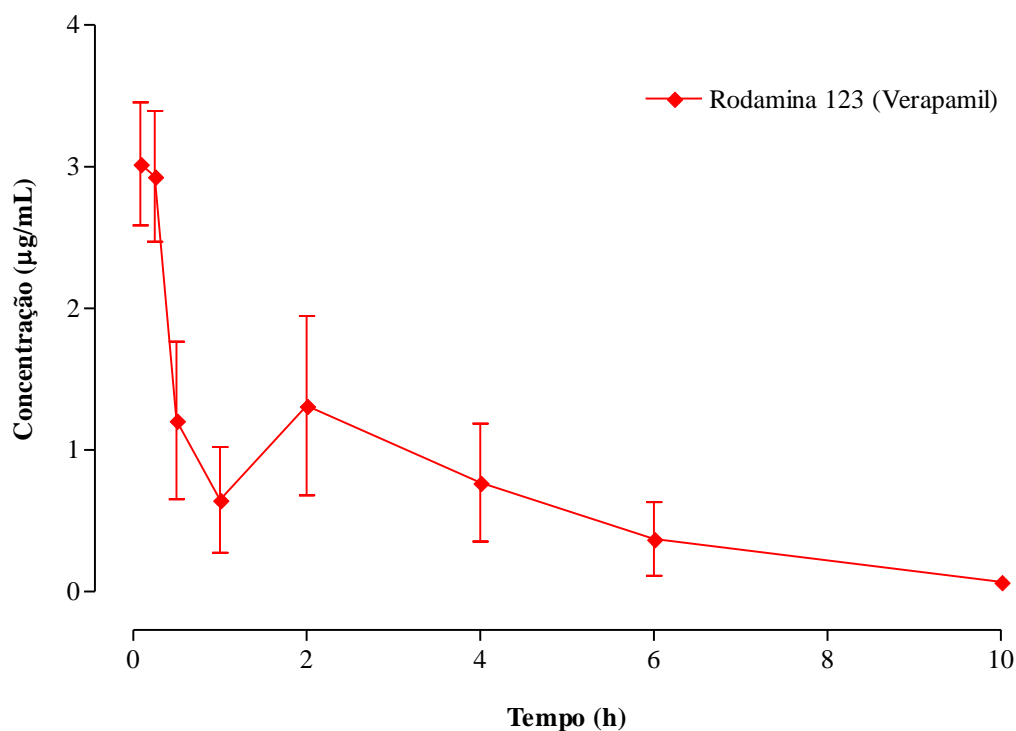


Figura 8. Perfis plasmáticos concentração-tempo obtidos para a rodamina 123 em ratos Wistar, pré-tratados com verapamil em carboximetilcelulose, após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 µg/kg de rodamina 123. Os símbolos representam a média±desvio padrão de 5 determinações por ponto do tempo (n = 5).

A análise das amostras de sangue colhidas de cada um dos animais 15 min antes da administração de rodamina 123, ou seja, 1,45 h após pré-tratamento oral com verapamil em carboximetilcelulose, indicou uma intensidade de fluorescência correspondente a concentrações bastante inferiores ao limite de quantificação do método, indicando que possíveis metabolitos do verapamil gerados *in vivo* não comprometem a selectividade do método para a determinação da rodamina 123 em plasma de rato.

4.2.3. Análise farmacocinética dos perfis plasmáticos de rodamina 123

As concentrações plasmáticas médias obtidas, em função do tempo, para a rodamina 123 foram sujeitas a uma análise cinética não-compartimental. Para melhor visualizar as diferenças existentes entre os perfis de rodamina 123 na ausência e na presença de pré-tratamento com verapamil, os perfis plasmáticos médios obtidos foram representados conjuntamente (Figura 9) e os principais parâmetros farmacocinéticos estimados apresentam-se na tabela 10.

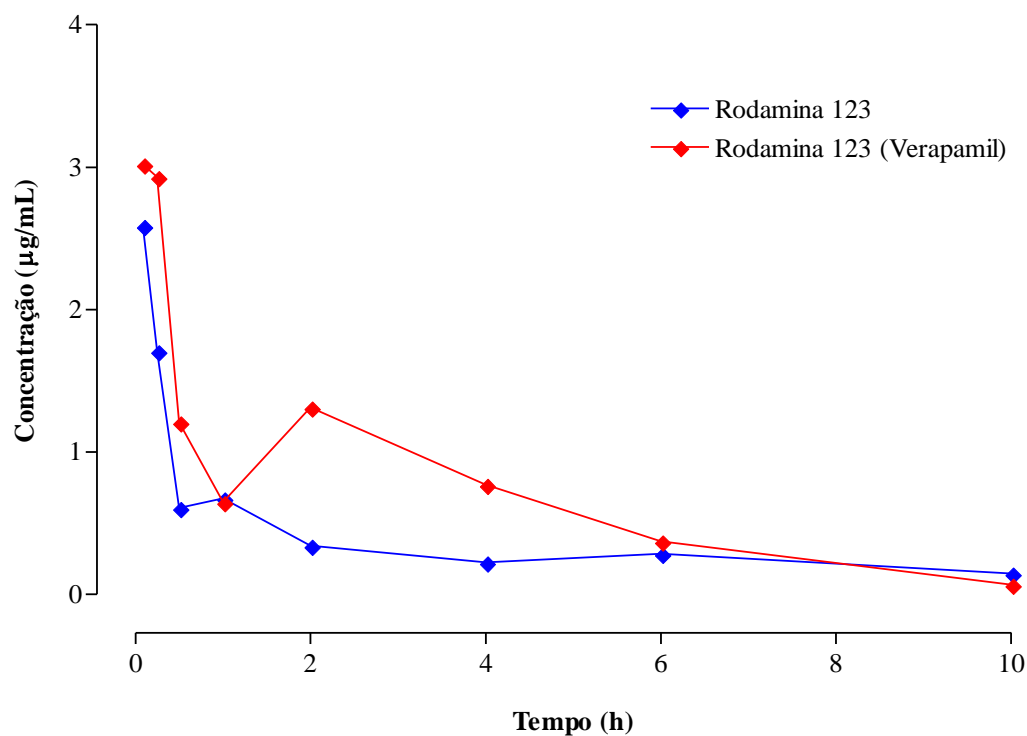


Figura 9. Perfis plasmáticos médios concentração-tempo de rodamina 123 obtidos em ratos Wistar após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 µg/kg de rodamina 123, na ausência e na presença de pré-tratamento com verapamil. Os símbolos representam a média de 5 determinações por ponto do tempo (n = 5).

Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos plasmáticos para a rodamina 123 estimados mediante análise farmacocinética não-compartimental dos perfis plasmáticos médios concentração-tempo obtidos em ratos Wistar após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 µg/kg de rodamina 123, na ausência e na presença de pré-tratamento com verapamil.

Parâmetros	Rodamina 123	Rodamina 123 (Verapamil)
#C _{max(C0)} (µg/mL)	3,183	3,063
AUC _{0-t} (µg.h/mL)	3,660	6,823
AUC _{0-∞} (µg.h/mL)	4,680	6,997
AUC _{t-∞} extrapolada (%)	21,8	2,5
AUC _{C0} extrapolada (%)	5,1	3,6

Concentração máxima extrapolada ao tempo zero (0,0 horas) com base nas duas primeiras observações experimentais em gráfico semi-logarítmico.

Para avaliar as diferenças existentes na magnitude de exposição sistêmica à rodamina 123 (substrato marcador da actividade da gp-P) quando administrada em ratos Wistar pré-tratados ou não com verapamil (inibidor da actividade da gp-P), alguns dos parâmetros farmacocinéticos mais relevantes estimados foram relacionados e as razões respectivas entre as condições experimentais consideradas rodamina 123 / rodamina 123 (verapamil) foram calculadas e representadas graficamente (Figura 10).

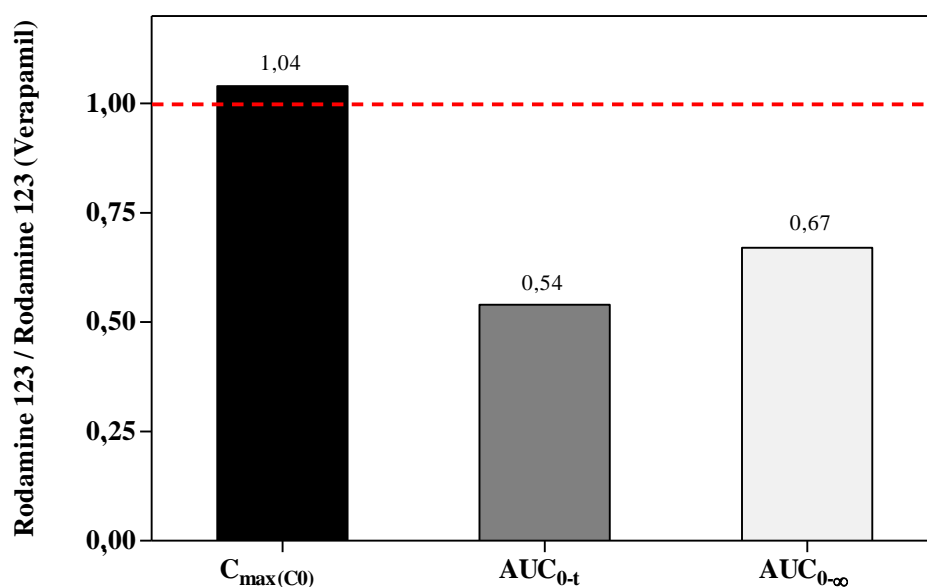


Figura 10. Razão para os parâmetros farmacocinéticos $C_{\max}(C_0)$, AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$ estimados a partir dos perfis plasmáticos médios obtidos para a rodamina 123 após a administração intravenosa em bólus de uma dose única de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a ratos Wistar pré-tratados ou não com verapamil.

5. DISCUSSÃO

Com o início do trabalho de investigação conducente à realização desta dissertação de Mestrado, concretizava-se um dos objectivos de carácter geral assumido de forma mais determinante nos últimos tempos no seio da equipa de investigação: desenvolver trabalho de natureza científica numa linha de investigação directamente relacionada com a modulação da actividade da gp-P, um transportador de efluxo reconhecidamente associado à farmacorresistência e determinante na biodisposição de xenobióticos, entre os quais se incluem muitos fármacos.

Embora sejam múltiplas as abordagens experimentais capazes de proporcionarem novos conhecimentos científicos no âmbito da avaliação funcional da actividade de efluxo mediada pela gp-P, a maioria dos trabalhos publicados recorre a técnicas bioanalíticas para explorar a acumulação intracelular, o transporte através de monocamadas de células e/ou a biodisposição *in vivo* de substratos da gp-P. Entre os substratos sonda usados mais frequentemente *in vivo* como marcadores da actividade de efluxo da gp-P incluem-se a digoxina, a fexofenadina, o talinolol (FISCHER *et al.*, 2005) e também a rodamina 123 (KAGEYAMA *et al.*, 2005; FOGER *et al.*, 2006). Consequentemente, a disponibilidade de um método bioanalítico para a determinação quantitativa de um dos substratos da gp-P é determinante para investigar a modulação funcional da actividade desta glicoproteína. A rodamina 123, pelas suas propriedades, uma sonda fluorescente e pouco tóxica comumente usada para avaliar a actividade de efluxo da P-gp, foi o substrato seleccionado.

No entanto, o trabalho planeado aquando da concepção inicial desta dissertação não visava o desenvolvimento e a validação de um método fluorimétrico para a determinação quantitativa da rodamina 123 como acabou por acontecer, mas antes o desenvolvimento e a validação de um método de cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC) com detecção no ultravioleta (UV). Pois, as técnicas de HPLC para além de quantitativas são também separativas, característica que oferece vantagens adicionais perante amostras complexas como são, em geral, as amostras biológicas, possibilitando a separação e a quantificação simultânea de diversas substâncias presentes numa mesma amostra.

Efectivamente, dadas as propriedades fluorescentes da rodamina 123 não foi com surpresa que se constatou que a maior parte das técnicas de HPLC referidas na literatura para quantificar a rodamina 123 usavam como sistema de detecção um detector de fluorescência (YUMOTO *et al.*, 1999; ANDO *et al.*, 2001; MICUDA *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008; BERGINC *et al.*, 2009; CERMANOVA *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2009). Para além destas, também outras técnicas de HPLC já tinham sido descritas para a quantificação da rodamina 123, em particular, uma técnica publicada por IQBAL e colaboradores (2005) para quantificação da rodamina 123 a partir de lisados celulares por HPLC-UV, a qual terá sido devidamente validada e apresentou um limite de quantificação bastante baixo (2,5 ng/mL) (IQBAL *et al.*, 2005). Foi este trabalho de IQBAL *et al.* (2005) que nos levou a acreditar na possibilidade de podermos implementar facilmente no nosso laboratório uma técnica de HPLC-UV para a determinação quantitativa da rodamina 123 que pudesse suportar os estudos futuros a realizar no âmbito da identificação de inibidores da actividade gp-P. Todavia, as dificuldades que foram surgindo, em especial a indisponibilidade a partir de determinada altura de um sistema de HPLC, levaram-nos a procurar alternativas viáveis capazes de possibilitarem a quantificação do analito desejado, a rodamina 123, em amostras biológicas. Face à situação decidiu-se apostar no desenvolvimento e validação de uma técnica fluorimétrica para a quantificação da rodamina 123. De facto, eram muitos os trabalhos já existentes na bibliografia que também tinham considerado a determinação quantitativa da rodamina 123 a partir de amostras biológicas por fluorimetria ou espectrofluorimetria, embora não sejam geralmente apresentados dados relativos à validação, ainda que sumária, desses métodos (NADAKAVUKAREN *et al.*, 1985; HIRSCH-ERNST *et al.*, 1998; PIQUETTE-MILLER *et al.*, 1998; KONISHI *et al.*, 2004; KAGEYAMA *et al.*, 2005; FOGER *et al.*, 2006; MORIGUCHI *et al.*, 2007; SACHS-BARRABLE *et al.*, 2007; BARTA *et al.*, 2008; CATALIOTO *et al.*, 2008; HO *et al.*, 2008; HOU *et al.*, 2008; ITAGAKI *et al.*, 2008; JIA e WASAN, 2008; NISHIMURA *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2009; NAKAGAWA *et al.*, 2009). Assim, o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico fluorimétrico com capacidade para permitir um elevado número de análises num reduzido período de tempo (análises em sistema de microplacas de 96 ou 384 poços) seria uma ferramenta essencial para suportar um programa sistemático de *screening* e de avaliação de compostos de síntese ou de origem natural na inibição da actividade funcional da gp-P.

Uma vez que não se conhecem recomendações claras a aplicar especificamente na validação de métodos bioanalíticos de fluorimetria, as recomendações internacionais relativas à validação de métodos bioanalíticos cromatográficos destinados a estudos farmacocinéticos de natureza não-clínica e clínica foram consideradas, sempre que possível, no processo de validação do método fluorimétrico desenvolvido para a quantificação da rodamina 123 em plasma de rato (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). Naturalmente, as exigências na validação de um método bioanalítico dependerão sempre do tipo de método e do fim ao qual ele se destina, de qualquer forma, a selectividade, a curva de calibração (modelo de calibração e gama de linearidade) e o limite de quantificação, a precisão e exactidão, a recuperação do analito e a estabilidade do analito na matriz biológica deverão ser sempre parâmetros a considerar para garantir a fiabilidade dos resultados gerados. De facto, os métodos bioanalíticos para a quantificação de fármacos e metabolitos em amostras biológicas, pela qualidade dos dados que fornecem, desempenham um papel determinante na avaliação e interpretação dos resultados decorrentes de ensaios não-clínicos, clínicos ou outros (SHAH *et al.*, 2000; GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2001). Neste sentido, o papel das ciências bioanalíticas é extremamente importante nos programas de descoberta e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos.

Por outro lado, nos últimos anos, a interdependência crescente entre os países fez emergir a necessidade da aceitação internacional dos resultados provenientes dos métodos analíticos e, conseqüentemente, para garantir um nível comum mínimo de qualidade, o uso de métodos validados é cada vez mais uma condição indispensável. Os resultados gerados por métodos não validados são desprovidos de qualquer significado e não são reconhecidos pelas autoridades oficiais (HARTMANN *et al.*, 1998). Conseqüentemente, desde o início da década de 90, altura em que foi realizada a primeira conferência acerca da validação de métodos analíticos “*Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies*”, que se tem vindo a discutir que parâmetros de fiabilidade e que critérios de aceitação devem ser estabelecidos para validar um método bioanalítico (SHAH *et al.*, 1992; SHAH *et al.*, 2000).

Certo é que o sucesso do processo de validação implica a existência prévia de um método analítico desenvolvido adequadamente (DADGAR *et al.*, 1995). De facto, não é possível demarcar o processo de validação de um método analítico das respectivas

condições de desenvolvimento, pois são os estudos de validação que determinam se o estado de desenvolvimento do método é satisfatório ou se são requeridas alterações ao procedimento analítico e posterior revalidação, ou seja, é portanto um processo iterativo (GREEN, 1996; CHANDRAN e SINGH, 2007). Geralmente, um método analítico bem desenvolvido será fácil de validar, ou seja, os critérios de aceitação dos parâmetros de validação que asseguram a aceitabilidade do método serão certamente cumpridos (CHANDRAN e SINGH, 2007). Assim, o desenvolvimento de um novo método analítico poderá ser considerado então a fase mais crítica de todo o processo (EURACHEM GUIDE, 1998). Neste contexto, salientar também que os métodos bioanalíticos usados durante os programas de desenvolvimento de novos fármacos são, em regra, sujeitos a modificações constantes para suportar estudos específicos, sendo requeridos níveis diferentes de validação para demonstrar continuamente a validade dos ensaios (SHAH *et al.*, 2000).

Inevitavelmente, no processo de desenvolvimento e validação de um método bioanalítico são múltiplas as variáveis a considerar, desde logo atender à matriz biológica usada (que deverá ser aquela das amostras pretendidas), ao procedimento de colheita da amostra e ao tempo que medeia até à análise, ao sistema de detecção e ao tratamento dos dados (BRESSOLLE *et al.*, 1996; SHAH *et al.*, 2000).

Em particular, o método fluorimétrico acabado de descrever foi desenvolvido e validado considerando a sua aplicação à determinação da rodamina 123 a partir de plasma de rato. A selecção desta matriz biológica (plasma) poderá parecer desadequada, pelo menos numa primeira perspectiva, pois, tal como referido previamente nesta dissertação, os modelos experimentais mais usados para investigar a modulação da actividade da gp-P compreendem essencialmente modelos *in vitro* de linhas celulares que expressam constitutivamente ou são induzidas a expressar a gp-P. Porém, apesar de algum conhecimento importante adquirido tendo por base ensaios conduzidos nestes modelos *in vitro*, a verdade é que passaram já mais de 30 anos e ainda aguardamos pela introdução clínica do primeiro fármaco inibidor da gp-P com uma relação risco-benefício aceitável. Estes dados levaram-nos a pensar que a realização de estudos sistemáticos num modelo vivo poderia ser uma aproximação mais promissora na identificação de inibidores da gp-P que sejam bons candidatos a fármacos. Por outro lado, algumas evidências recentes apontam espécies do reino vegetal como uma fonte potencial de bons inibidores da gp-P (ZHOU *et al.*, 2004; MARCHETTI *et al.*, 2007;

BANSAL *et al.*, 2008; BANSAL *et al.*, 2009; ALVAREZ *et al.*, 2010) e, na opinião de alguns autores (COTT, 2008; MARKOWITZ *et al.*, 2008), os resultados decorrentes de modelos *in vitro* são, muitas vezes, desprovidos de significado quando extrapolados para as condições *in vivo*, especialmente no que respeita aos efeitos de extractos vegetais ou dos seus constituintes. Segundo estes autores, os estudos realizados *in vitro* usam, muitas vezes, concentrações extremamente elevadas de extractos vegetais ou dos seus constituintes fitoquímicos (centenas a milhares de vezes superiores às concentrações plasmáticas reais alcançadas *in vivo*). Além disso, muitos dos fitoquímicos presentes em extractos vegetais não são absorvidos após administração oral e/ou sofrem um extenso metabolismo de primeira passagem, de tal forma que a sua biodisponibilidade sistémica é seriamente comprometida. É por isso que COTT (2008) e MARKOWITZ *et al.* (2008) acabaram mesmo por referir que os estudos de interações realizados *in vitro* envolvendo constituintes de origem natural são uma fonte de informação muitas vezes não confirmada em modelos *in vivo* e desprovida de significado clínico, sugerindo mesmo que é tempo de reavaliar o valor dos modelos *in vitro* usados em programas de *screening* da bioactividade de extractos de plantas ou dos seus constituintes isolados (COTT, 2008; MARKOWITZ *et al.*, 2008).

O reconhecimento destas limitações apontadas aos modelos *in vitro* associado ao potencial de muitos fitoquímicos enquanto candidatos a fármacos inibidores da gp-P, justifica plenamente o porquê de se ter seleccionado a matriz de plasma de rato para o desenvolvimento do método fluorimétrico apresentado para quantificação da rodamina 123. Pois, os estudos futuros que se pretendem desenvolver neste âmbito passarão, certamente, pela avaliação *in vivo* (no rato) do potencial de extractos de plantas ou dos seus constituintes isolados na inibição da actividade de efluxo mediada pela gp-P. Mediante o uso de um modelo experimental deste tipo e atendendo também a aproximações aceites e usadas vulgarmente na estimação das doses a testar, parece-nos ser possível conseguir dados relevantes relativos à inibição da gp-P por extractos de plantas ou pelos seus constituintes, sem contribuímos significativamente para a acumulação de informação potencialmente irrelevante.

Assim, a disponibilidade de uma técnica fluorimétrica, simples e rápida, que permitisse a quantificação de rodamina 123 em plasma de rato constituiria uma ferramenta extremamente útil para a investigação *in vivo*, não-clínica, de potenciais interações com a actividade funcional da gp-P.

Com o intuito de reduzir os recursos necessários e de otimizar o desenvolvimento do método, considerou-se como ponto de partida a informação experimental proveniente de outras técnicas de fluorimetria e de espectrofluorimetria anteriormente aplicadas à quantificação da rodamina 123 (NADAKAVUKAREN *et al.*, 1985; HIRSCH-ERNST *et al.*, 1998; PIQUETTE-MILLER *et al.*, 1998; KONISHI *et al.*, 2004; KAGEYAMA *et al.*, 2005; FOGER *et al.*, 2006; MORIGUCHI *et al.*, 2007; SACHS-BARRABLE *et al.*, 2007; BARTA *et al.*, 2008; CATALIOTO *et al.*, 2008; HO *et al.*, 2008; HOU *et al.*, 2008; ITAGAKI *et al.*, 2008; JIA e WASAN, 2008; NISHIMURA *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2009; NAKAGAWA *et al.*, 2009). Como ponto de partida, recolheu-se a informação relativa aos procedimentos empregues na preparação das amostras biológicas e os respectivos comprimentos de onda de excitação e de emissão usados para quantificar a rodamina 123. Em relação ao procedimento de preparação das amostras considerou-se, primariamente, desde logo, as técnicas que usavam a precipitação de proteínas. Pois, este procedimento de preparação de amostras é simples, rápido e relativamente económico. Durante a recolha da informação bibliográfica identificaram-se condições de excitação e de emissão para a rodamina 123 bastante díspares. Tal facto parece dever-se, fundamentalmente, a alterações na intensidade de fluorescência da rodamina 123 condicionadas pela natureza do meio em que o analito se encontrava.

Tendo por base a informação obtida da literatura iniciaram-se então ensaios de desenvolvimento no sentido de identificar as melhores condições para a quantificação da rodamina 123 a partir do plasma de rato. Testaram-se vários agentes precipitantes para promover a desproteinização das amostras (metanol, acetonitrilo, ácido tricloroacético, ácido perclórico, entre outros) e os melhores resultados foram conseguidos com acetonitrilo usando como condições de detecção os comprimentos de onda de excitação e de emissão de 480 nm e 575 nm, respectivamente. Estas condições de preparação das amostras e de detecção proporcionaram boa selectividade e uma elevada sensibilidade (declive muito acentuado na recta de calibração, indicando que pequenas variações na concentração condicionam variações importantes na resposta). Porém, usando outras condições de detecção, ainda que aproximadas das seleccionadas, um decréscimo significativo na sensibilidade era notório.

Com as condições de preparação das amostras e de detecção estabelecidas procedeu-se então ao estudo dos parâmetros de validação mais relevantes. Os resultados conseguidos demonstraram a selectividade do método para quantificar a rodamina 123

em amostras de plasma de rato, mesmo na presença de potenciais interferentes (heparina, carboximetilcelulose e verapamil) usados comumente em estudos experimentais *in vivo* destinados a avaliar a modulação da actividade da gp-P. A linearidade do método foi demonstrada numa gama de concentrações relativamente alargada (0,04-4 µg/mL) e o limite de quantificação estabelecido para a rodamina 123 foi relativamente baixo (0,04 µg/mL), embora superior ao definido por alguns métodos cromatográficos. Além disto, o método demonstrou ser preciso e exacto e permitiu uma elevada recuperação da rodamina 123 a partir de amostras de plasma fortificadas com o analito. Nas condições testadas durante os ensaios de estabilidade, a rodamina 123 também mostrou ser estável na matriz de plasma de rato. Assim, a selectividade, sensibilidade, precisão e exactidão demonstrada por este método fluorimétrico, aliadas à simplicidade técnica e à rapidez analítica proporcionada pelo uso de microplacas de 96 poços, permitem inferir acerca da utilidade relevante desta ferramenta bioanalítica para suportar estudos sistemáticos de *screening* conducentes à identificação de potenciais inibidores da gp-P.

Pretendendo demonstrar-se a aplicabilidade do método à quantificação da rodamina 123 em amostras reais, foram então realizados alguns estudos experimentais em ratos com o objectivo de avaliar a capacidade do método para identificar potenciais inibidores da actividade funcional da gp-P. Consequentemente, procedeu-se à administração mediante bólus intravenoso de uma dose única de rodamina 123 a ratos Wistar, pré-tratados ou não com verapamil (inibidor clássico da actividade de efluxo mediada pela gp-P), e seguiu-se a cinética plasmática da rodamina 123 durante as 10 h subsequentes à respectiva administração em ambas as condições experimentais (na ausência e na presença de pré-tratamento com verapamil). No desenho experimental destes estudos considerou-se a instituição de jejum nocturno, condição que se estendeu até 4 h após o pré-tratamento oral dos animais, procedimento destinado a minimizar a interferência dos alimentos na biodisponibilidade oral do verapamil e mesmo na inibição da gp-P, pois é largamente reconhecido que constituintes da dieta podem inibir a actividade da gp-P. A doses de rodamina 123 (500 µg/kg, i.v.) e de verapamil (25 mg/kg, *per os*) foram seleccionadas tendo por base indicações bibliográficas (KAGEYAMA *et al.*, 2005; BANSAL *et al.*, 2009) e estudos preliminares realizados para garantir concentrações plasmáticas de rodamina 123 superiores ao limite de

quantificação do método fluorimétrico durante todo o período do estudo farmacocinético.

Da análise visual dos perfis plasmáticos médios concentração-tempo obtidos após a administração intravenosa de uma dose única de 500 µg/kg de rodamina 123 em ratos pré-tratados ou não com verapamil, pode constatar-se, de imediato, diferenças importantes na exposição sistémica à rodamina 123. Efectivamente, sendo o verapamil um inibidor clássico da gp-P, os resultados obtidos estão em conformidade com o que seria de esperar: uma maior exposição sistémica à rodamina 123 na presença do inibidor da gp-P. Adicionalmente, mediante a análise farmacocinética não-compartimental dos perfis plasmáticos médios concentração-tempo obtidos para a rodamina 123, nas condições experimentais já discutidas, constatou-se, efectivamente, pelo valor dos parâmetros cinéticos estimados que melhor traduzem a extensão de exposição sistémica (AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$), uma menor magnitude de exposição à rodamina 123 na ausência de verapamil. Isto está claramente demonstrado na figura 10 quando se relacionaram estes parâmetros cinéticos obtidos na ausência e na presença de verapamil. As razões para a AUC_{0-t} rodamina 123/rodamina 123 (verapamil) e para a $AUC_{0-\infty}$ rodamina 123/rodamina 123 (verapamil) são largamente inferiores à unidade.

Estas observações globais permitem-nos confiar no potencial deste método fluorimétrico como ferramenta de suporte para a identificação de novos inibidores da gp-P candidatos a fármacos, esperando-se identificar substâncias cujo desenvolvimento posterior possibilite a sua aplicação clínica e a reversão da MDR associada à gp-P.

6. CONCLUSÕES

A execução deste trabalho possibilitou, indiscutivelmente, o desenvolvimento e a implementação laboratorial de uma técnica bioanalítica com capacidade para suportar muitos dos estudos que irão decorrer, certamente num futuro próximo, no âmbito de um programa alargado de *screening* farmacológico conducente à identificação e avaliação de potenciais candidatos a fármacos como inibidores da gp-P. O método desenvolvido permitirá inferir indirectamente, através da avaliação do perfil cinético da rodamina 123 (substrato sonda da actividade de efluxo da gp-P), acerca da inibição *in vivo* da gp-P mediada por moléculas resultantes de síntese química, de extractos vegetais ou dos seus constituintes isolados, usando-se o verapamil como controlo positivo para a inibição da actividade da gp-P.

Em síntese, apresentam-se as conclusões mais relevantes de todo este trabalho de investigação conducente à realização desta dissertação de Mestrado:

- Desenvolveu-se e validou-se um método fluorimétrico capaz de determinar quantitativamente as concentrações de rodamina 123 na matriz biológica de plasma de rato. Em termos práticos, as condições experimentais requeridas são simples e pouco dispendiosas e a técnica mostrou ser selectiva, sensível, precisa e exacta numa gama de concentrações considerável. A disponibilidade de uma ferramenta bioanalítica deste tipo permitirá apoiar futuros estudos farmacológicos a desenvolver no âmbito da modelação da actividade de efluxo mediada pela gp-P, em particular, na pesquisa de candidatos a fármacos como inibidores desta glicoproteína e com potencial para a reversão da MDR associada à gp-P, especialmente no cancro.

- O método fluorimétrico desenvolvido foi aplicado com sucesso à quantificação da rodamina 123 em amostras reais de plasma de rato provenientes de ensaios experimentais conduzidos na ausência e na presença de verapamil. Efectivamente, foram notórias as diferenças observadas no perfil cinético da rodamina 123 após a sua administração a ratos pré-tratados ou não com verapamil, demonstrando-se assim a capacidade discriminativa de método.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGORAM B., WOLTOSZ W.S., BOLGER M.B. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. **Adv Drug Deliv Rev.** 50 (2001) S41-S67.
- ALVAREZ A.I., REAL R., PEREZ M., MENDOZA G., PRIETO J.G., MERINO G. Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. **J Pharm Sci.** 99:2 (2010) 598-617.
- AMPASAVATE C., SOTANAPHUN U., PHATTANAWASIN P., PIYAPOLRUNGROJ N. Effects of Curcuma spp. on P-glycoprotein function. **Phytomedicine.** 17:7 (2010) 506-512.
- ANDO H., NISHIO Y., ITO K., NAKAO A., WANG L., ZHAO Y.L., KITAICHI K., TAKAGI K., HASEGAWA T. Effect of Endotoxin on P-Glycoprotein-Mediated Biliary and Renal Excretion of Rhodamine-123 in Rats. **Antimicrob Agents Chemother.** 45:12 (2001) 3462-3467.
- ANUCHAPREEDA S., LEECHANACHAI P., SMITH M.M., AMBUDKAR S.V., LIMTRAKUL P. Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human KB cells. **Biochem Pharmacol.** 64:4 (2002) 573-582.
- ASZALOS A. Drug-drug interactions affected by the transporter protein, P-glycoprotein (ABCB1, MDR1) I. Preclinical aspects. **Drug Discov Today.** 12:19-20 (2007) 833-837.
- BALAYSSAC D., AUTHIER N., CAYRE A., COUDORE F. Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug-drug interactions? **Toxicol Lett.** 156:3 (2005) 319-329.
- BANSAL T., JAGGI M., KHAR R.K., TALEGAONKAR S. Emerging Significance of Flavonoids as P-Glycoprotein Inhibitors in Cancer Chemotherapy. **J Pharm Pharm Sci.** 12:1 (2009) 46-78.
- BANSAL T., AWASTHI A., JAGGI M., KHAR R.K., TALEGAONKAR S. Pre-clinical evidence for altered absorption and biliary excretion of irinotecan (CPT-11) in combination with quercetin: possible contribution of P-glycoprotein. **Life Sci.** 83:7-8 (2008) 250-259.
- BARTA C.A., SACHS-BARRABLE K., FENG F., WASAN K.M. Effects of Monoglycerides on P-Glycoprotein: Modulation of the Activity and Expression in Caco-2 Cell Monolayers. **Mol Pharm.** 5:5 (2008) 863-875.
- BAYET C., FAZIO C., DARBOUR N., BERGER O., RAAD I., CHABOUD A., DUMONTET C., GUILLET D. Modulation of P-glycoprotein activity by acridones and coumarins from Citrus sinensis. **Phytother Res.** 21:4 (2007) 386-390.

- BERGINC K., ZAKELJ S., URSIC D., KRISTL A. Aged Garlic Extract Stimulates P-Glycoprotein and Multidrug Resistance Associated Protein 2 Mediated Effluxes. **Biol Pharm Bull.** 32: 4 (2009) 694-699.
- BREEDVELD P., BEIJNEN J.H., SCHELLENS J.H.M. Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. **Trends Pharmacol Sci.** 27:1 (2006) 7-24.
- BRESSOLLE F., BROMET-PETIT M., AUDRAN M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **J Chromatogr B Biomed Appl.** 686:1 (1996) 3-10.
- CASCORBI I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. **Pharmacol Ther.** 112:2 (2006) 457-473.
- CATALIOTO R.M, TRIOLO A., GIULIANI S., ALTAMURA M., EVANGELISTA S., MAGGI C.A. Increased Paracellular Absorption by Bile Salts and P-Glycoprotein Stimulated Efflux of Otilonium Bromide in Caco-2 Cells Monolayers as a Model of Intestinal Barrier. **J Pharm Sci.** 97:9 (2008) 4087-4100.
- CERMANOVA J., FUKSA L., BRČAKOVA E., HROCH M., KUCERA O., KOLOUCHOVA G., HIRSOVA P., MALAKOVA J., STAUD F., MARTINKOVA J., CERVINKOVA Z., MICUDA S. Up-regulation of renal Mdr1 and Mrp2 transporters during amiodarone pretreatment in rats. **Pharmacol Res.** 61:2 (2010) 129-135.
- CHAN L.M.S., LOWES S., HIRST B.H. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. **Eur J Pharm Sci.** 21:1 (2004) 25-51.
- CHANDRAN S., SINGH R.S.P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. **Pharmazie.** 62:1 (2007) 4-14.
- CHIELI E., ROMITI N., RODEIRO I., GARRIDO G. In vitro effects of *Mangifera indica* and polyphenols derived on ABCB1/P-glycoprotein activity. **Food Chem Toxicol.** 47:11 (2009) 2703-2710.
- CHOI C.H., KANG G., MIN Y.D. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by protopanaxatriol ginsenosides from Korean red ginseng. **Planta Med.** 69:3 (2003) 235-240.
- COLEY H.M. Mechanisms and consequences of chemotherapy resistance in breast cancer. **Ejc supplements.** 7:1 (2009) 3-7.
- COON J.T., ERNST E. Panax ginseng: a systematic review of adverse effects and drug interactions. **Drug Saf.** 25: 5 (2002) 323-344.
- COTT J.M. Herb-Drug Interactions: Theory *versus* Practice. **Mol Nutr Food Res.** 52 (2008) 745-746.

DADGAR D., BURNETT P.E., CHOC M.G., GALLICANO K., HOOPER J.H. Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. **J Pharm Biomed Anal.** 13:2 (1995) 89-97.

DE CASTRO W.V., MERTENS-TALCOTT S., DERENDORF H., BUTTERWECK V. Grapefruit juice-drug interactions: Grapefruit juice and its components inhibit P-glycoprotein (ABCB1) mediated transport of talinolol in Caco-2 cells. **J Pharm Sci.** 96:10 (2007) 2808-2817.

DEL AMO E.M., HEIKKINEN A.T., MONKKONEN J. In vitro-in vivo correlation in P-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption. **Eur J Pharm Sci.** 36:2-3 (2009) 200-211.

DI MARCO M.P., EDWARDS D.J., WAINER I.W., DUCHARME M.P. The effect of grapefruit juice and seville orange juice on the pharmacokinetics of dextromethorphan: The role of gut CYP3A and P-glycoprotein. **Life Sci.** 71:10 (2002) 1149-1160.

DI PIETRO A., CONSEIL G., PEREZ-VICTORIA J.M., DAYAN G., BAUBICHON-CORTAY H., TROMPIER D., STEINFELS E., JAULT J.M., DE WET H., MAITREJEAN M., COMTE G., BOUMENDJEL A., MARIOTTE A.M., DUMONTET C., MCINTOSH D.B., GOFFEAU A., CASTANYS S., GAMARRO F., BARRON D. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. **Cell Mol Life Sci.** 59:2 (2002) 307-322.

EL-READI M.Z., HAMDAN D., FARRAG N., EL-SHAZLY A., WINK M. Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from Citrus species in human colon and leukaemia cell lines. **Eur J Pharmacol.** 626:2-3 (2010) 139-145.

FERREIRA M.J., DUARTE N., GYEMANT N., RADICS R., CHEREPNEV G., VARGA A., MOLNAR J. Interaction between doxorubicin and the resistance modifier stilbene on multidrug resistant mouse lymphoma and human breast cancer cells. **Anticancer Res.** 26:5A (2006) 3541-3546.

FISCHER V., EINOLF H.J., COHEN D. Efflux Transporters and their Clinical Relevance. **Mini Rev Med Chem.** 5:2 (2005) 183-195.

FOGER F., SCHMITZ T., BERNKOP-SCHNURCH A. *In vivo* evaluation of an oral delivery system for P-gp substrates based on thiolated chitosan. **Biomaterials.** 27:23 (2006) 4250-4255.

FONG W.F., WAN C.K., ZHU G.Y., CHATTOPADHYAY A., DEY S., ZHAO Z., SHEN XL. Schisandrol A from Schisandra chinensis reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by affecting Pgp-substrate complexes. **Planta Med.** 73:3 (2007) 212-220.

GLAESER H., BAILEY D.G., DRESSER G.K., GREGOR J.C., SCHWARZ U.I., MCGRATH J.S, JOLICOEUR E., LEE W., LEAKE B.F., TIRONA R.G., KIM R.B. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. **Clin Pharmacol Ther.** 81:3 (2006) 362-370.

GOTTESMAN M.M., LING V. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. **FEBS Lett.** 580:4 (2006) 998-1009.

GOTTESMAN M.M., PASTANT I., AMBUDKAR S.V. P-glycoprotein and multidrug resistance. **Curr Opin Genet Dev.** 6:5 (1996) 610-617.

GREEN J.M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. **Anal Chem.** 68 (1996) 305A-309A.

GUIDANCE FOR INDUSTRY: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM. May 2001.

HANSEN T.S., NILSEN O.G. Echinacea purpurea and P-glycoprotein drug transport in Caco-2 cells. **Phytother Res.** 23:1 (2009) 86-91.

HARTMANN C., SMEYERS-VERBEKE J., MASSART D.L., MCDOWALL R.D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **J Pharm Biomed Anal.** 17:2 (1998) 193-218.

HE L., ZHAO C., YAN M., ZHANG L.Y., XIA Y.Z. Inhibition of P-glycoprotein function by procyanidine on blood-brain barrier. **Phytother Res.** 23:7 (2009) 933-937.

HELLUM B.H., TOSSE A., HOYBAKK K., THOMSEN M., ROHLOFF J., NILSEN O.G. Potent in vitro inhibition of CYP3A4 and P-glycoprotein by *Rhodiola rosea*. **Planta Med.** 76: 4 (2010) 331-338.

HENNESSY M., SPIERS J.P. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. **Pharmacol Res.** 55:1 (2007) 1-15.

HIRSCH-ERNST K.I., ZIEMANN C., FOTH H., KOZIAN D., SCHMITZ-SALUE C., KAHL G.F. Induction of *mdr1b* mRNA and P-Glycoprotein Expression by Tumor Necrosis Factor Alpha in Primary Rat Hepatocyte Cultures. **J Cell Physiol.** 176:3 (1998) 506-515.

HO P.Y., YEH T.K., YAO H.T., LIN H.L., WU H.Y, LO Y.K., CHANG Y.W., CHIANG T.H., WU S.H.W., CHAO Y.S., CHEN C.T. Enhanced oral bioavailability of paclitaxel by d- α -tocopheryl polyethylene glycol 400 succinate in mice. **Int J Pharm.** 359:1-2 (2008) 174-181

HOU X.L., TAKAHASHI K., TANAKA K., TOUGOU K., QIU F., KOMATSU K., TAKAHASHI K., AZUMA J. *Curcuma* drugs and curcumin regulate the expression and function of P-gp in Caco-2 cells in completely opposite ways. **Int J Pharm.** 358:1-2 (2008) 224-229.

- HU Y.J., SHEN X.L., LU H.L., ZHANG Y.H., HUANG X.A., FU L.C., FONG W.F. Tenacigenin B derivatives reverse P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in HepG2/Dox cells. **J Nat Prod.** 71:6 (2008) 1049-1051.
- HUANG B.B., LI G.F., REN F., TANG Z.K., MA H.F., SUN Y.B., CHEN L.J., YANG L. Effect of Glycyrrhiza inflata and Daphne genkwa on permeabilities of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate across rat jejunum membranes in vitro. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.** 33:21 (2008) [Abstract].
- HUNTER J., HIRST B.H. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. **Adv Drug Deliv Rev.** 25:2-3 (1997) 129-157.
- IKEGAWA T., FUMIHIKO U., KOYABU N., MORIMOTO S., SHOYAMA Y., NAITO M., TSURUO T., OHTANI H., SAWADA Y. Inhibition of P-glycoprotein by orange juice components, polymethoxyflavones in adriamycin-resistant human myelogenous leukemia (K562/ADM) cells. **Cancer Lett.** 160:1 (2000) 21-28.
- ISHIKAWA T., HIRANO H., ONISHI Y., SAKURAI A., TARUI S. Functional Evaluation of ABCB1 (P-Glycoprotein) Polymorphisms: High-Speed Screening and Structure-Activity Relationship Analyses. **Drug Metab Pharmacokinet.** 19:1 (2004) 1-14.
- ITAGAKI S., OCHIAI A., KOBAYASHI M., SUGAWARA M., HIRANO T., ISEKI K. Interaction of Coenzyme Q10 with the Intestinal Drug Transporter P-Glycoprotein. **J Agric Food Chem.** 56:16 (2008) 6923-6927.
- JIA J.X., WASAN K.M. Effects of Monoglycerides on Rhodamine 123 Accumulation, Estradiol 17 β -D-Glucuronide Bidirectional Transport and MRP2 Protein Expression within Caco-2 cells. **J Pharm Pharm Sci.** 11:3 (2008) 45-62.
- JIANG Z., LU Y., KE W., LI X., YU Y. A Sensitive LC Method with Fluorescence Detector for the Determination of Rhodamine 123 in Cell Lysate. **Chromatographia.** 68:1-2 (2008) 111-116.
- JIAO W., DONG W., LI Z., DENG M., LU R. Lathyrane diterpenes from Euphorbia lathyris as modulators of multidrug resistance and their crystal structures. **Bioorg Med Chem.** 17:13 (2009) 4786-4792.
- JODOIN J., DEMEULE M., BELIVEAU R. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. **Biochim Biophys Acta.** 1542:1-3 (2002) 149-159.
- JULIANO R.L., LING V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochim Biophys Acta.** 455:1 (1976) 152-162.

JUNYAPRASERT V.B., SOONTHORNCHAREONNON N., THONGPRADITCHOTE S., MURAKAMI T., TAKANO M. Inhibitory effect of Thai plant extracts on P-glycoprotein mediated efflux. **Phytother Res.** 20:1 (2006) 79-81.

KAGEYAMA M., NAMIKI H., FUKUSHIMA H., ITO Y., SHIBATA N., TAKADA K. *In Vivo* Effects of Cyclosporin A and Ketoconazole on the Pharmacokinetics of Representative Substrates for P-Glycoprotein and Cytochrome P450 (CYP) 3A in Rats. **Biol Pharm Bull.** 28: 2 (2005) 316-322.

KIM S.W., KWON H.Y., CHI D.W., SHIM J.H., PARK J.D., LEE Y.H., PYO S., RHEE D.K. Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by Ginsenoside Rg₃. **Biochem Pharmacol.** 65:1 (2003) 75-82.

KNIGHT B., TROUTMAN M., THAKKER D.R. Deconvoluting the effects of P-glycoprotein on intestinal CYP3A: a major challenge. **Curr Opin Pharmacol.** 6:5 (2006) 528-532.

KONISHI T., SATSU H., HATSUGAI Y., AIZAWA K., INAKUMA T., NAGATA S., SAKUDA S., NAGASAWA H., SHIMIZU M. Inhibitory effect of a bitter melon extract on the P-glycoprotein activity in intestinal Caco-2 cells. **Br J Pharmacol.** 143:3 (2004) 379-387.

KRISHNA R., MAYER L.D. Multidrug resistance (MDR) in cancer; Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. **Eur J Pharm Sci.** 11:4 (2000) 265-283.

KUPPENS I.E., BREEDVELD P., BEIJNEN J.H., SCHELLENS J.H. Modulation of oral drug bioavailability: from preclinical mechanism to therapeutic application. **Cancer Invest.** 23:5 (2005) 443-464.

LI X.X., ZHOU Z.W., ZHOU S.F. Role of P-glycoprotein in the transport of tanshinone I, one active triterpenoid from *Salvia miltiorrhiza*. **Drug Metab Lett.** 2:3 (2008) 223-230.

LI X., SUN B., ZHU C.J., YUAN H.Q., SHI Y.Q., GAO J., LI S.J., LOU H.X. Reversal of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance by macrocyclic bisbibenzyl derivatives in adriamycin-resistant human myelogenous leukemia (K562/A02) cells. **Toxicol In Vitro.** 23:1 (2009) 29-36.

LIM S., GRASSI J., AKHMEDJANOVA V., DEBITON E., BALANSARD G., BELIVEAU R., BARTHOMEUF C. *Haplophyllum perforatum* and cytotoxicity pattern versus diphyllin, podophyllotoxin and etoposide. **Planta Med.** 73:15 (2007) 1563-1567.

LIN J.H., YAMAZAKI M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. **Clin Pharmacokinet.** 42:1 (2003) 59-98.

LISCOVITCH M., LAVIE Y. Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research. **IDrugs.** 5:4 (2002) 349-355.

- LIU H., LIU X., JIA L., LIU Y., YANG H., WANG G., XIE L. Insulin therapy restores impaired function and expression of P-glycoprotein in blood–brain barrier of experimental diabetes. **Biochem Pharmacol.** 75:8 (2008) 1649-1658.
- MADUREIRA A.M, MOLNAR A., ABREU P.M., MOLNAR J., FERREIRA M.J. A new sesquiterpene-coumarin ether and a new abietane diterpene and their effects as inhibitors of P-glycoprotein. **Planta Med.** 70:9 (2004) 828-833.
- MARCHETTI S., MAZZANTI R., BEIJNEN J.H., SCHELLENS J.H. Clinical relevance of drug drug and herb drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). **Oncologist.** 12:8 (2007) 927-941.
- MARKOWITZ J.S., VON MOLTKE L.L., DONOVAN, J.L. Predicting interactions between conventional medications and botanical products on the basis of *in vitro* investigations. **Mol Nutr Food Res.** 52:7 (2008) 747-754.
- MCDEVITT C.A., CALLAGHAN R. How can we best use structural information on P-glycoprotein to design inhibitors? **Pharmacol Ther.** 113:2 (2007) 429-441.
- MERTENS-TALCOTT S.U, DE CASTRO W.W, MANTHEY J.A., DERENDORF H., BUTTERWECK V. Polymethoxylated flavones and other phenolic derivatives from citrus in their inhibitory effects on P-glycoprotein-mediated transport of talinolol in Caco-2 cells. **J Agric Food Chem.** 55:7 (2007) 2563-2568.
- MICUDA S., FUKSA L., MUNDLOVA L., OSTERREICHER J., MOKRY J., CERMANOVA J., BRCAKOVA E., STAUD F., POKORNA P., MARTINKOVA J. Morphological and Functional Changes in P-glycoprotein During Dexamethasone-Induced Hepatomegaly. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 34:4 (2007) 296-303.
- MIN Y.D., KWON H.C., YANG M.C., LEE K.H., CHOI S.U., LEE K.R. Isolation of limonoids and alkaloids from *Phellodendron amurense* and their multidrug resistance (MDR) reversal activity. **Arch Pharm Res.** 30:1 (2007) 58-63.
- MODOK S., MELLOR H.R., CALLAGHAN R. Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. **Curr Opin Pharmacol.** 6:4 (2006) 350–354.
- MORIGUCHI J., KATO R., NAKAGAWA M., HIROTANI Y., IJIRI Y., TANAKA K. Effects of lipopolysaccharide on intestinal P-glycoprotein expression and activity. **Eur J Pharmacol.** 565:1-3 (2007) 220-224.
- NABEKURA T., YAMAKI T., KITAGAWA S. Effects of chemopreventive citrus phytochemicals on human P-glycoprotein and multidrug resistance protein 1. **Eur J Pharmacol.** 600:1-3 (2008) 45-49.

- NABEKURA T., YAMAKI T., HIROI T., UENO K., KITAGAWA S. Inhibition of anticancer drug efflux transporter P-glycoprotein by rosemary phytochemicals. **Pharmacol Res.** 61:3 (2010) 259-263.
- NADAKAVUKAREN K.K., NADAKAVUKAREN J.J., CHEN L.B. Increased Rhodamine 123 Uptake by Carcinoma Cells. **Cancer Res.** 45 (1985) 6093-6099.
- NAKAGAWA S., DELI M.A., KAWAGUCHI H., SHIMIZUDANI T., SHIMONO T., KITTEL A., TANAKA K., NIWA M. A new blood–brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. **Neurochem Int.** 54: 3-4 (2009) 253-263.
- NGUYEN V.T.B., DARBOUR N., BAYET C., DOREAU A., RAAD I., PHUNG B. H., DUMONTET C., DI PIETRO A., DIJOUX-FRANCA M.G., GUILLET D. Selective modulation of P-glycoprotein activity by steroidal saponines from Paris polyphylla. **Fitoterapia.** 80:1 (2009) 39-42.
- NISHIMURA A., HONDA N., SUGIOKA N., TAKADA K., SHIBATA N. Evaluation of Carbamazepine Pharmacokinetic Profiles in Mice with Kainic Acid-Induced Acute Seizures. **Biol Pharm Bull.** 31:12 (2008) 2302-2308.
- OWUSU M.K., KAMUHABWA A.R., NSHIMO C., VAN BOVEN M., DE WITTE P.A. Investigation of fractions present in the stem bark of *Annickia kummeriae* on their P-glycoprotein inhibitory pump activity. **Phytother Res.** 18:8 (2004) 652-657.
- OZBEN T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. **FEBS Lett.** 580:12 (2006) 2903-2909.
- OZVEGY-LACZKA C., CSEREPES J., ELKIND N.B, SARKADI B. Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. **Drug Resist Updat.** 8:1-2 (2005) 15-26.
- PAL D., MITRA A.K. MDR- and CYP3A4-mediated drug-drug interactions. **J Neuroimmune Pharmacol.** 1:3 (2006) 323-339.
- PATANASETHANONT D., NAGAI J., YUMOTO R., MURAKAMI T., SUTTHANUT K., SRIPANIDKULCHAI B.O., YENJAI C., TAKANO M. Effects of *Kaempferia parviflora* extracts and their flavone constituents on P-glycoprotein function. **J Pharm Sci.** 96:1 (2007) 223-233.
- PETERS F.T, MAURER H.H. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. **Accred Qual Assur.** 7:11 (2002) 441-449.
- PIQUETTE-MILLER M., PAK A., KIM H., ANARI R., SHAHZAMANI A. Decreased Expression and Activity of P-Glycoprotein in Rat Liver During Acute Inflammation. **Pharm Res.** 15:5 (1998) 706-711.

- PLOUZEK C.A., CIOLINO H. P., CLARKE R., YEH G.C. Inhibition of P-glycoprotein activity and reversal of multidrug resistance in vitro by rosemary extract. **Eur J Cancer**. 35:10 (1999) 1541-1545.
- ROMITI N., PELLATI F., NIERI P., BENVENUTI S., ADINOLFI B., CHIELI E. P-Glycoprotein inhibitory activity of lipophilic constituents of Echinacea pallida roots in a human proximal tubular cell line. **Planta Med**. 74:3 (2008) 264-266.
- ROMITI N., TRAMONTI G., CORTI A., CHIELI E. Effects of Devil's Claw (Harpagophytum procumbens) on the multidrug transporter ABCB1/P-glycoprotein. **Phytomedicine**. 16:12 (2009) 1095-1100.
- ROMITI N., TRAMONTI G., DONATI A., CHIELI E. Effects of grapefruit juice on the multidrug transporter P-glycoprotein in the human proximal tubular cell line HK-2. **Life Sci**. 76:3 (2004) 293-302.
- SHEN Q., LIN Y., HANDA T., DOI M., SUGIE M., WAKAYAMA K., OKADA N., FUJITA T., YAMAMOTO A. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by in vitro transport and in situ absorption studies. **Int J Pharm**. 313:1-2 (2006) 49-56.
- SACHS-BARRABLE K., THAMBOO A., LEE S. D., WASAN K.M. Lipid Excipients Peceol and Gelucire 44/14 Decrease P-glycoprotein Mediated Efflux of Rhodamine 123 Partially due to Modifying P-glycoprotein Protein Expression within Caco-2 Cells. **J Pharm Pharm Sci**. 10:3 (2007) 319-331.
- SHAH V.P., MIDHA K.K., DIGHE S., MCGILVERAY I.J., SKELLY J.P., YACOBI A., LAYLOFF T., VISWANATHAN C.T., COOK C.E., MCDOWALL R.D., PITTMAN K.A., SPECTOR S. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic studies. **Pharm Res**. 9:4 (1992) 588-592.
- SHAH V.P., KAMAL K.M., FINDLAY J.W.A., HILL H.M., HULSE J.D., MCGILVERAY I.J., MCKAY G., MILLER K.J., PATNAIK R.N., POWEL M.L., TONELLI A., VISWANATHAN C.T., YACOBI A. Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. **Pharm Res**. 17:12 (2000) 1551-1557.
- SHTIL A.A. Multifactorial drug resistance: P-glycoprotein on the apex of the pyramid. **J Hematother Stem Cell Res**. 11:2 (2002) 437-439.
- SHUKLA S., WU C.P., AMBUDKAR S.V. Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**. 4:2 (2008) 205-223.
- STOUCH T.R., GUDMUNDSSON O. Progress in understanding the structure-activity relationships of P-glycoprotein. **Adv Drug Deliv Rev**. 54:3 (2002) 315-328.

TAKANAGA H., OHNISHI A., MATSUO H., SAWADA Y. Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in caco-2 cells. **Biol Pharm Bull.** 21:10 (1998)1062-1066.

TAKANAGA H., OHNISHI A., YAMADA S., MATSUO H., MORIMOTO S., SHOYAMA Y., OHTANI H., SAWADA Y. Polymethoxylated Flavones in Orange Juice Are Inhibitors of P-glycoprotein but Not Cytochrome P450 3A4. **J Pharmacol Exp Ther.** 293:4 (1999) 230-236.

TAKARA K., SAKAEDA T., OKUMURA K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy. **Curr Pharm Des.** 12:3 (2006) 273-286.

TAKEUCHI T., NONAKA M., YOSHITOMI S., HIGUCHI T., EBIHARA T., MAESHIBA Y., KAWASE M., ASAHI S. Marked impact of P-glycoprotein on the absorption of TAK-427 in rats. **Biopharm Drug Dispos.** 29:6 (2008) 311-323.

TANG P. M.K., CHAN J.Y.W., ZHANG D.M., AU S.W.N., FONG W.P., KONG S.K., TSUI S.K.W., WAYE M.M.Y., MAK T.C.W., FUNG K.W. Pheophorbide a, an Active Component in *Scutellaria barbata*, Reverses P-glycoprotein-mediated Multidrug Resistance on a Human Hepatoma Cell Line R-HepG2. **Cancer Biol Ther.** 6:4 (2007) e1-e6.

THOMAS H., COLEY H.M. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein. **Cancer Control.** 10:2 (2003) 159-165.

TSURUO T., LIDA H., TSUKAGOSHI S., SAKURAI Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. **Cancer Res.** 41:5 (1981) 1967-1972.

VARMA M.V.S., PERUMAL O.P., PANCHAGNULA R. Functional role of P-glycoprotein in limiting peroral drug absorption: optimizing drug delivery. **Curr Opin Chem Biol.**10:4 (2006) 367-373.

VARMA M.V.S., ASHOKRAJ Y., DEY S., PANCHAGNULA R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. **Pharmacol Res.** 48:4 (2003) 347-359.

VERSCHRAAGEN M., KOKS C.H.W., SCHELLENS J.H.M., BEIJNEN J.H. P-Glycoprotein system as a determinant of drug interactions: The case of Digoxin-Verapamil. **Pharmacol Res.** 40:4 (1999) 301-306.

WANG E.J., CASCIANO C.N., CLEMENT R.P., JOHNSON W.W. Inhibition of P-glycoprotein transport function by grapefruit juice psoralen. **Pharm Res.** 18:4 (2001) 432-438.

WANG E., BARECKI-ROACH M., JOHNSON W.W. Elevation of P-glycoprotein function by a catechin in green tea. **Biochem Biophys Res Commun.** 297 (2002) 412-418.

WANG T.X., YANG X.H. Reversal effect of isotetrandrine, an isoquinoline alkaloid extracted from *Caulis Mahoniae*, on P-glycoprotein-mediated doxorubicin-resistance in human breast cancer (MCF-7/DOX) cells. **Yao Xue Xue Bao.** 43:5 (2008) [Abstract].

WANG Y., CAO J., ZENG S. Involvement of P-glycoprotein in regulating cellular levels of Ginkgo flavonols: quercetin, kaempferol, and isorhamnetin. **J Pharm Pharmacol.** 57:6 (2005) 751-758.

WIELING J., HENDRIKS G., TAMMINGA W.J., HEMPENIUS J., MENSINK C.K., OOSTERHUIS B., JONKMAN J.H.G. Rational experimental design for validation bioanalytical methods Illustration using an assay method for total captopril in plasma. **J Chromatogr A.** 730:1-2 (1996) 381-394.

YOO H.H., LEE M., CHUNG H.J., LEE S.K., KIM D.H. Effects of diosmin, a flavonoid glycoside in citrus fruits, on P-glycoprotein-mediated drug efflux in human intestinal Caco-2 cells. **J Agric Food Chem.** 55:18 (2007) 7620-7625.

YUMOTO R., MURAKAMI T., NAKAMOTO Y., HASEGAWA R., NAGAI J., TAKANO M. Transport of Rhodamine 123, a P-Glycoprotein Substrate, across Rat Intestine and Caco-2 Cell Monolayers in the Presence of Cytochrome P-450 3A-Related Compounds. **J Pharm Exp Ther.** 289:1 (1999) 149-155.

YOO H.H., LEE M., LEE M.W., LIM S.Y., SHIN J., KIM D.H. Effects of Schisandra lignans on P-glycoprotein-mediated drug efflux in human intestinal Caco-2. **Planta Med.** 73:5 (2007) 444-450.

YOSHIDA N., TAKAGI A., KITAZAWA H., KAWAKAMI J., ADACHI I. Inhibition of P-glycoprotein-mediated transport by extracts of and monoterpenoids contained in *Zanthoxyli Fructus*. **Toxicol Appl Pharmacol.** 209:2 (2005) 167-173.

ZHOU S.F., ZHOU Z.W., LI C.G., CHEN X., YU X., XUE C.C., HERINGTON A. Identification of drugs that interact with herbs in drug development. **Drug Discov Today.** 12: 15-16 (2007) 664-673.

ZHOU S., LIM L.Y., CHOWBAY B. Herbal modulation of P-glycoprotein. **Drug Metab Rev.** 36: 1 (2004) 57-104.

ZHU H.J., WANG J.S., MARKOWITZ J.S., DONOVAN J.L., GIBSON B.B, GEFROH H.A., DEVANE C. L. Characterization of P-glycoprotein inhibition by major cannabinoids from marijuana. **J Pharmacol Exp Ther.** 317:2 (2006) 850-857.