

Fábio Micael da Silva Pinho

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “O Mecanismo Molecular de Efluxo de Fármacos pela Glicoproteína-P” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Joana Carvalho e do Professor Doutor Luís Loura e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Julho 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Fábio Micael da Silva Pinho

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “O Mecanismo Molecular de Efluxo de Fármacos pela Glicoproteína-P” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Joana Carvalho e do Professor Doutor Luís Loura e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Julho 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Fábio Micael da Silva Pinho, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013121816, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “O mecanismo molecular de efluxo de fármacos pela glicoproteína-P” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 17 de julho de 2017.



(Fábio Micael da Silva Pinho)

Agradecimentos

Toda a experiência vivida e adquirida a nível académico é marcada por momentos especiais. E o que aconteceu ao longo deste período de estágio e realização de Monografia, com a evolução profissional e pessoal que pude ter a todos os níveis, foi um desses momentos, que não podia ter sido uma realidade se não fosse acompanhado por quem me acolheu. Neste sentido, é imperioso dedicar um agradecimento especial:

- Professor Doutor Luís Loura, por todo o acompanhamento excelente que me permitiu, sempre em tempo útil cumprir com os objetivos da minha vida pessoal.

- Dr. Pedro Amaro, por ter dado a possibilidade de ser integrado como estagiário na Farmácia Rodrigues da Silva em Coimbra e pelos conhecimentos transmitidos.

- Dr^a Joana Carvalho, por ser quanto a mim o modelo ideal daquele que deve ser o Farmacêutico, neste caso, de Farmácia Comunitária, por toda a disponibilidade e entrega a todos os níveis da minha aprendizagem, dentro e fora do período de estágio, enquanto conciliou as funções obrigatórias enquanto Diretora Técnica, e sobretudo pela mensagem que transmite de que todos temos de querer ser melhores enquanto Farmacêuticos.

- Dr^a Joana Santos, por toda a disponibilidade em ajudar a enriquecer as minhas aptidões enquanto futuro profissional.

- Dr^a Ana Luísa Silva e ao Dr. Rui Lopes, pela excelente ajuda na execução de todas as tarefas.

- Meu amigo e também estagiário André Lourenço, por toda a natural camaradagem demonstrada em todas as tarefas executas ou não em conjunto.

- A todos os anteriores, um sincero agradecimento que se traduz nos laços de amizade criados.

- Finalmente, a toda a minha família chegada, Pai, Mãe o meu irmão Joel, os meus avós Manuel e Zínia, que me acompanham há vários anos nesta caminhada, e que são a primeira razão pelo qual aqui escrevo.

Índice

Parte I – Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária.....	1
Abreviaturas	2
1. Introdução	3
2. Análise SWOT	4
2.1. Pontos Fortes	4
2.1.1. Localização e horário de funcionamento.....	4
2.1.2. Recursos humanos.....	4
2.1.3. Espaço de atendimento.....	5
2.1.4. Relação farmacêutico-utente.....	5
2.1.5. Serviços prestados	5
2.1.6. Versatilidade da equipa de trabalho	6
2.1.7. Tecnologia adaptada (SIFARMA 2000®).....	6
2.1.8. Acompanhamento do procedimento de faturação	6
2.1.9. Gestão dos <i>stocks</i>	6
2.1.10. Gestão de resíduos.....	7
2.1.11. Importância do “ <i>backoffice</i> ”	7
2.1.12. Gestão “invisível”	7
2.1.13. Planeamento do estágio.....	8
2.2. Pontos Fracos	9
2.2.1. Falta de produtos ortopédicos.....	9
2.2.2. Não realização de manipulados	9
2.2.3. Falta de locais de estacionamento próximos.....	9
2.2.4. Ausência instalações para administração injetáveis.....	9
2.2.5. Preparação/Aptidão prática individual.....	9
2.3. Oportunidades.....	10
2.3.1. Diversidade de utentes	10
2.3.2. Prescrições eletrónicas.....	10
2.3.3. Possibilidade de prática de diversos idiomas	10
2.3.4. Participação em formações.....	11
2.3.5. Cartão Saúde.....	11
2.4. Ameaças	11
2.4.1. Número de farmácias na área geográfica envolvente	11
2.4.2. Postos de venda de MNRSM.....	11

2.4.3. Atualização de preços/comparticipações dos medicamentos.....	11
2.4.4. Dificuldade de promoção Medicamentos Genéricos.....	12
2.4.5. Situação económica do país.....	12
3. Casos Práticos	13
3.1. Gripes e constipações.....	13
3.2. Problemas musculares/articulares.....	13
4. Conclusão	14
5. Referências Bibliográficas	15

Parte II – Monografia Intitulada "O mecanismo molecular de efluxo de fármacos pela glicoproteína-P"	16
Abreviaturas	17
Resumo.....	18
Abstract.....	19
1. Multirresistências	20
2. Mecanismos de Resistência.....	21
3. Transportadores ABC (ATP-Binding Cassette Transporters).....	24
4. P-gp (Glicoproteína-P)	28
4.1. Estrutura, distribuição nos tecidos e função da P-gp (ABCB1).....	28
4.2. Distribuição nos tecidos e função fisiológica (21).....	30
4.3. Mecanismos de ação possíveis pela P-gp.....	30
4.3.1. Modelo "Vacuum Cleaner"	30
4.3.2. Modelo "Flipase".....	31
4.4. Alterações da expressão e atividade da P-gp	32
4.5. Características responsáveis pela afinidade a substratos/inibidores	33
4.5.1. Fluidez da membrana plasmática.....	33
4.5.2. Hidrofobicidade	33
4.5.3. Carácter anfílico do substrato.....	34
5. Regulação constitutiva da expressão.....	34
5.1. Co-regulação com outros transportadores ABC	34
5.2. Co-regulação com expressão de CYP 450.....	35
5.3. Induzida por stress	35
5.3.1. Inflamação.....	36
5.3.2. Quimioterapia	36
5.3.3. Heat-shock.....	36

5.3.4. Radiação ionizante.....	37
6. Indução ou inibição da P-gp como estratégia terapêutica.....	37
6.1. Mecanismos de indução e indutores / “Ativadores da P-gp”.....	37
6.2. Mecanismos de inibição e inibidores.....	38
6.3. Inibidores da P-gp de origem natural.....	40
7. Conclusão.....	40
8. Bibliografia.....	42

Parte I

Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária

ABREVIATURAS

ANF – Associação Nacional de Farmácias

ACSS – Administração Central do Sistema de Saúde I.P.

BPF – Boas Práticas Farmacêuticas

IMC – Índice de Massa Corporal

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

OMS – Organização Mundial de Saúde

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. INTRODUÇÃO

A Farmácia Comunitária representa a vertente com maior visibilidade da atividade farmacêutica sendo, muitas vezes, o primeiro local procurado pelos utentes para obter acesso aos serviços de saúde. Desta forma e, segundo o Artigo 9º do Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos, o Farmacêutico assume um papel preponderante na sociedade, “cumprindo-lhe executar todas as tarefas que ao medicamento concernem, (...) contribuir para a salvaguarda da saúde pública e todas as ações de educação dirigidas à comunidade no âmbito da promoção da saúde” (1).

O processo de formação profissional do Farmacêutico começa na aquisição de conhecimentos ao longo do curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), que proporciona a oportunidade de conhecer a área científica da Farmácia e das ciências relacionadas, e culmina na frequência do estágio curricular, que representa uma ferramenta chave para consolidar e pôr em prática todos os conhecimentos teóricos, bem como para adquirir todo o tipo de competências técnicas, sociais e pessoais necessárias para o exercício da profissão farmacêutica.

Desta forma, tive a oportunidade de realizar o estágio curricular na Farmácia Rodrigues da Silva, situada na baixa da cidade de Coimbra, durante o período de 9 de janeiro a 23 de junho de 2017. O estágio decorreu sob orientação permanente da Dr.^a Joana Carvalho e sempre com o apoio importante de uma equipa de trabalho exemplar, que me permitiu sentir como parte integrante de um serviço de saúde pública, tornando-se numa experiência enriquecedora a todos os níveis e permitindo tomar contacto com a realidade global da profissão.

No presente relatório irei descrever os conhecimentos adquiridos ao longo do estágio através de uma análise SWOT, que contempla pontos fortes (*Strengths*), pontos fracos (*Weaknesses*), oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*).

2. ANÁLISE SWOT

2.1. PONTOS FORTES

2.1.1. Localização e horário de funcionamento

A Farmácia Rodrigues da Silva situa-se na Baixa da cidade de Coimbra, concretamente na Rua Ferreira Borges. Esta zona caracteriza-se pela abundância de serviços e área que a rodeiam, bem como por ser uma zona histórica da cidade, atraindo muitos turistas. Esta condição proporciona a procura dos serviços por uma maior diversidade de utentes, sendo por isso possível consolidar e aplicar conhecimentos de várias áreas dentro do sector do medicamento e cosmética. Além do horário de funcionamento nos dias úteis (das 8h30m às 19h30m), este estabelecimento encontra-se também em atividade aos sábados das 9h às 19h, o que não acontece com todas as Farmácias da zona, mas que revela que existe o objetivo de proporcionar uma maior disponibilidade para os utentes.

2.1.2. Recursos humanos

A Farmácia Rodrigues da Silva é constituída por uma equipa técnica bastante qualificada, composta por:

- Dr^a Rosa, Farmacêutica e Proprietária
- Dr. Pedro Amaro, Farmacêutico e Gestor da Farmácia
- Dr^a Joana Carvalho, Farmacêutica e Diretora Técnica
- Dr^a Joana Santos, Farmacêutica
- Dr^a Ana Luísa, Técnica de Farmácia
- Dr. Rui Lopes, Técnico de Farmácia
- Sr^a Isabel, empregada de limpeza

É uma equipa dinâmica e unida, capaz de desempenhar todas as funções que lhe são atribuídas e que demonstra um bom espírito de equipa, contribuindo para a estabilidade e boa gestão necessárias ao normal funcionamento da Farmácia. Por outro lado, é importante salientar o facto de a equipa conseguir acompanhar em qualquer momento e em simultâneo qualquer atividade extra que esteja a decorrer na farmácia, bem como integrar e permitir um excelente acompanhamento na evolução do estagiário.

2.1.3. Espaço de atendimento

A Farmácia Rodrigues da Silva possui uma área de atendimento ao público organizada, apelativa e diversificada a nível de produtos, que por si só induz uma expectativa de bom acolhimento por parte dos profissionais de saúde a que os utentes recorrem. Por outro lado, gostaria de salientar a estética atribuída aos três balcões de atendimento, que se localizam ligeiramente afastados, uma técnica que permite um atendimento mais personalizado, garantindo uma maior relação de confidencialidade com o utente e promovendo o seu bem-estar e confiança com o profissional.

2.1.4. Relação farmacêutico-utente

Foi por demais evidente constatar que esta Farmácia executa o seu trabalho de forma séria e profissional, ao ponto de ter um número significativo de utentes a solicitar os seus serviços de forma recorrente. Daqui se nota a vontade pelo cumprimento da premissa de proporcionar o melhor serviço, com qualidade, e que resulta na confiança depositada pelos utentes. Neste âmbito, foi-me permitido ganhar experiência com um maior número de utentes, fazer um acompanhamento da sua medicação, bem como exercitar frequentemente técnicas de aconselhamento e venda adequados, virados não só, mas também para potenciais novos utentes.

2.1.5. Serviços prestados

A Farmácia Rodrigues da Silva proporciona aos seus utentes diversos serviços de saúde como a medição dos níveis de glicémia, colesterol e pressão arterial. É também disponibilizada uma balança que permite não só medir a pressão arterial, mas também a altura e o peso, o cálculo do IMC e percentagem de massa gorda/magra. Desta forma, é possível uma intervenção imediata por parte do Farmacêutico no aconselhamento, educação e promoção da saúde, no âmbito das suas competências, em situações de necessidades comuns em que os utentes têm a confiança e facilidade de poder recorrer. Assim, foi possível executar a maioria destes serviços e aconselhar o utente mediante os resultados obtidos. Sempre que verifiquei que o utente apresentava valores mais afastados dos considerados normais segundo a OMS, e era necessária esta intervenção, tive a hipótese de efetuar aconselhamento nomeadamente promovendo a melhoria do estilo de vida com uma dieta saudável, prática de exercício físico, incentivando à abstenção de álcool e tabaco.

2.1.6. Versatilidade da equipa de trabalho

O fato de toda a equipa ser composta por elementos dotados de formação académica superior permite que o trabalho seja efetuado com a melhor qualidade possível, na medida em que todos possuem as competências necessárias para efetuar todo o tipo de tarefas com rigor, excetuando as tarefas que são da responsabilidade da Diretora Técnica. Este foi o principal fator que conduziu a que durante o estágio adquirisse aptidões para um desempenho técnico mais ágil e multifacetado.

2.1.7. Tecnologia adaptada (SIFARMA 2000®)

Todo o tipo de tarefas que são levadas a cabo na Farmácia Rodrigues da Silva têm como suporte o SIFARMA 2000®, um *software* prático, abrangente e intuitivo que permite analisar e gerir tudo o que respeita a entradas e saídas de produtos (encomendas, vendas, devoluções, *stock* disponível), efetuar qualquer tipo de vendas (com ou sem receita médica), analisar e recolher documentos relativos à faturação, consultar toda a informação necessária aplicável aos produtos (princípio ativo, posologia, precauções, contraindicações, localização na Farmácia), entre outros. Esta ferramenta representa o suporte essencial de gestão que acompanha todo o tipo de tarefas que são efetuadas diariamente.

2.1.8. Acompanhamento do procedimento de faturação

Houve oportunidade de acompanhar algumas vezes o processo de faturação, e perceber a importância desta operação na gestão da Farmácia. Este procedimento é efetuado pelo Farmacêutico e envolve a conferência, correção e envio do receituário para a ACSS, juntamente com os documentos de faturação exigidos, disponíveis no SIFARMA 2000®. Esta tarefa assume um papel muito importante principalmente na gestão financeira da Farmácia, sendo por isso uma mais valia ter acompanhado a realização do processo, uma vez que pode ser uma tarefa da minha responsabilidade no meu futuro profissional.

2.1.9. Gestão dos stocks

Através do SIFARMA 2000®, é possível estabelecer limites de *stock* mínimo e máximo para qualquer produto. Esses limites são estabelecidos tendo em conta a rotatividade do produto por um período de tempo definido, e permite que cada produto seja sinalizado automaticamente para encomenda, assim que se atinja o *stock* mínimo. Neste sentido, este processo torna-se essencial no controlo do circuito dos produtos e na gestão financeira da Farmácia, uma vez que permite uma gestão racional das encomendas, sem pôr em causa a disponibilidade dos produtos para os utentes.

2.1.10. Gestão de resíduos

A Farmácia Rodrigues da Silva possui um protocolo com a Valormed, uma sociedade sem fins lucrativos com funções de gestão de resíduos, embalagens vazias e medicamentos fora de uso. Existe uma sensibilização dos utentes para a importância ambiental e social desta iniciativa, e que permite à Farmácia fazer parte de uma solução de tratamento e gestão deste tipo de resíduos.

2.1.11. Importância do “backoffice”

Este fator constitui um passo essencial em praticamente todo o funcionamento da Farmácia. É certo que corresponde a uma diversidade de tarefas que não é “visível”, no entanto, serve de suporte ao bom funcionamento e gestão de todas as restantes tarefas. Durante o estágio, houve um período inicial de adaptação à realidade de todo o funcionamento da Farmácia, coincidente com este tipo de tarefas. Houve oportunidade de rececionar encomendas, conferir os números de fatura, quantidades encomendadas e recebidas e respetivos prazos de validade, de efetuar o acondicionamento de produtos nos locais respetivos, de forma a respeitar a regra de dispensa “*first-in, first-out*”, efetuar devoluções indicando obrigatoriamente o motivo de devolução e a fatura respeitante, conferência de contagens físicas dos stocks e prazos de validade, entre outros. Todo este processo demonstra claramente ser importante na execução das restantes tarefas, com foco no atendimento ao balcão, pois o conhecimento das localizações dos produtos e de todo o circuito de trabalho permite agilizar o atendimento e garantir que é empregue mais tempo no aconselhamento individualizado do utente.

2.1.12. Gestão “invisível”

Na minha perspetiva, é este o ponto que entendo como mais importante abordar. A par dos objetivos da Farmácia em termos de compromisso com a promoção da saúde e bem-estar dos utentes, está também implícita, numa perspetiva comercial, a necessidade de uma garantia de sustentabilidade financeira da Farmácia Rodrigues da Silva. Existe um trabalho importante e significativo do Dr. Pedro Amaro e da Dr^a Joana Carvalho no que respeita à gestão financeira da Farmácia, que envolve a análise das condições de compra e venda de qualquer produto dispensado aos utentes, e que exige um acompanhamento constante do mercado em geral, de forma a permitir conciliar a rotatividade dos produtos com as necessidades correntes dos utentes, aos preços mais económicos. Este processo torna-se, provavelmente, no passo mais importante de garantia da sustentabilidade e crescimento da Farmácia a curto e longo prazo.

2.1.13. Planeamento do estágio

Na perspetiva de estagiário e, a par do ponto anterior, este foi dos aspetos mais importantes que tenho oportunidade de descrever. Como referido anteriormente, este processo iniciou-se com um período de adaptação coincidente com o cumprimento das tarefas a nível de “*backoffice*”, que me permitiu adquirir as bases necessárias para todos os restantes processos de trabalho.

Posteriormente, houve também oportunidade de efetuar diversas medições dos parâmetros bioquímicos já referidos, bem como avançar para a etapa de atendimento ao balcão. Aqui, consegui expandir os conhecimentos já adquiridos, bem como aplicá-los a situações práticas. Como já descrito e, devido à localização geográfica da Farmácia, existe uma vasta gama de utentes de origem estrangeira, que estando de passagem, solicitam os serviços. Foi bastante enriquecedor poder aconselhar diversos tipos de produtos frequentemente solicitados por este tipo de utentes para situações práticas tais como proteção solar, cuidados de pele, higiene e cosmética, suplementos multivitamínicos, entre outros.

Por outro lado, foi também possível efetuar o acompanhamento de utentes já fidelizados à Farmácia. Neste âmbito, e dado que na maioria dos casos os utentes têm a particularidade de ter medicação prescrita regularmente, houve particular cuidado na compreensão e execução do processamento de diversos tipos de receitas, com foco nos organismos de comparticipação associados a cada caso, bem como entender algumas particularidades associadas ao processamento e dispensa de certos medicamentos (2), tais como Psicotrópicos e Estupefacientes, precauções relativas a Medicamentos de conservação no frio, instruções de conservação e acondicionamento de colírios, entre outros. Em qualquer dos casos, procurei ter o cuidado de fornecer a informação necessária quanto à posologia dos medicamentos, eventuais medidas não farmacológicas a tomar, tendo sempre como objetivo incentivar ao uso racional do medicamento e proporcionar uma correta educação para o estilo de vida saudável.

2.2. PONTOS FRACOS

2.2.1. Falta de produtos ortopédicos

Na minha opinião a falta de produtos de ortopedia para dispensa constitui um aspeto negativo, pois entendo que, embora não seja um tipo de produtos muito procurado pelos utentes, existem alguns casos, nomeadamente de utentes fidelizados, que creio justificarem a existência de alguns destes produtos para responder às suas necessidades. Por outro lado, também não permitiu que eu enquanto estagiário conseguisse adquirir experiência de conhecimento e aconselhamento deste tipo de produtos.

2.2.2. Não realização de manipulados

Na Farmácia Rodrigues da Silva não são realizados manipulados de medicamentos. Entendo esta falha importante pois embora sendo um tipo de serviço que é pouco prescrito e solicitado, constitui um serviço que caracteriza e distingue uma Farmácia enquanto estabelecimento de prestação de serviços de saúde, bem como dos seus profissionais.

2.2.3. Falta de locais de estacionamento próximos

Outro aspeto negativo que é visível consiste na falta de acesso a estacionamento próximo da farmácia, uma vez que a Rua Ferreira Borges se encontra fechada ao trânsito, diminuindo assim a possibilidade de maior acesso dos utentes aos serviços.

2.2.4. Ausência instalações para administração injetáveis

Foi recorrente os utentes solicitarem diversos medicamentos injetáveis, não sendo possível, no entanto, proceder à sua administração devido à falta de instalações físicas (sala individualizada) e equipamentos adequados (maca, etc.), obrigando os utentes a deslocarem-se a outro estabelecimento de saúde para cumprirem a administração dos medicamentos.

2.2.5. Preparação/Aptidão prática individual

Creio que este foi o fator menos positivo que evidenciei no estágio, enquadrado na preparação que é proporcionada a nível académico pelo MICF. Ao longo do curso, é efetuada uma série alargada de avaliações de conhecimentos teóricos a várias cadeiras, remetendo a aplicação prática desse conhecimento no exercício da profissão para um semestre de estágio, algo que considero manifestamente insuficiente. Compreendo e aceito que é necessário e faz sentido obter a melhor preparação possível a nível teórico, até porque esse é, no fundo, o suporte para o enquadramento a nível prático. No entanto, creio

existir alguma discrepância em relação ao período de tempo que deve ser atribuído a cada uma das componentes, isto porque, analisando por um lado a aprendizagem académica como uma forma especializada e eficaz de integração no mercado de trabalho e por outro a situação económica e social do país, seria de todo adequado atribuir um período de estágio superior ao instituído, na perspectiva de que qualquer aluno beneficia dessa experiência a nível pessoal se concluir o MICF e se sentir mais seguro, competente e integrado na prática profissional corrente.

2.3. OPORTUNIDADES

2.3.1. Diversidade de utentes

Como já referido anteriormente, a Farmácia Rodrigues da Silva tem a particularidade de ser procurada por diversos utentes de todas as faixas etárias e escalões sociais, oriundos tanto da cidade, como do resto do país e fora dele. Desta forma, existiu aqui uma oportunidade de alargar conhecimentos de todas as áreas científicas relacionadas com a Farmácia.

2.3.2. Prescrições eletrónicas

Desde o início do estágio que a Farmácia já operava com os novos procedimentos de receitas eletrónicas, algo que eu, embora tendo alguma experiência de estágios anteriores, nunca tive a oportunidade de contactar. Por outro lado, é de salientar o papel que este tipo de receitas tem na prática farmacêutica e particularmente no circuito do medicamento, uma vez que permite minimizar erros durante o atendimento e facilitar o processo de faturação.

2.3.3. Possibilidade de prática de diversos idiomas

Outro aspeto interessante que tive a oportunidade de experienciar foi relativamente à prática de outros idiomas. Mais uma vez, e relativamente ao facto de a Farmácia ser solicitada por muitos turistas, houve a necessidade de comunicar noutros idiomas, nomeadamente Inglês e Francês, o que reforçou o meu conhecimento no domínio destas línguas.

2.3.4. Participação em formações

Frequentemente, era proporcionada à Farmácia a presença dos seus profissionais em diversas formações respeitantes a várias áreas de produtos, que tornou a minha aprendizagem ainda mais enriquecedora. Este tipo de participações permitiu-me conhecer muitos produtos, marcas e técnicas de venda associadas, e que se traduziu claramente na minha evolução em relação à capacidade de resposta mais rápida e eficaz às necessidades dos utentes.

2.3.5. Cartão Saúde

Através deste cartão implementado pela ANF, os utentes acumulam pontos e obtêm algumas vantagens tais como descontos na compra de medicamentos ou outros produtos, ou até na aquisição de produtos de catálogo por troca de pontos. Este facto permite reforçar a possibilidade de fidelização dos clientes, uma vez que na Farmácia Rodrigues da Silva é comum a prática deste serviço.

2.4. AMEAÇAS

2.4.1. Número de farmácias na área geográfica envolvente

A localização geográfica da Farmácia Rodrigues da Silva caracteriza-se pelo elevado número de Farmácias em redor, que segundo uma perspetiva comercial proporciona naturalmente uma situação clara de concorrência, e que reforça a necessidade de implementar um sistema de gestão rigoroso. Enquanto futuro profissional, este facto também se manifesta importante, pois terá de haver sempre um cuidado especial a fim de satisfazer as necessidades dos utentes com eficácia e agilidade.

2.4.2. Postos de venda de MNRSM

Durante o meu período de estágio houve conhecimento da abertura de um novo espaço de venda de MNSRM. A manter-se esta tendência, vem constituir outra ameaça a nível de concorrência.

2.4.3. Atualização de preços/comparticipações dos medicamentos

O INFARMED I.P. procede a alterações trimestrais dos valores de participações dos medicamentos. Este fato levou a que fosse por vezes complicado ultrapassar o

descontentamento dos utentes devido às alterações dos preços, constituindo uma barreira à adesão à terapêutica.

2.4.4. Dificuldade de promoção Medicamentos Genéricos

Um dos aspetos importantes que identifiquei no atendimento ao público durante o meu estágio foi o facto de ainda existir alguma desconfiança dos utentes relativamente à utilização deste tipo de medicamentos. É pública a necessidade de promoção da prescrição e uso destes Medicamentos, referida a nível governamental pelas vantagens principalmente a nível financeiro que advêm da redução de despesas na saúde, no entanto, devido a notícias, informações diversas relativas a possíveis problemas associados e até às alegadas experiências dos próprios utentes, verifico que existe ainda alguma relutância na utilização destes medicamentos, que pode dificultar o objetivo desta promoção por parte dos Farmacêuticos (3).

2.4.5. Situação económica do país

A situação económica que o país atravessa induz os utentes a procurarem os melhores serviços/produtos aos melhores preços, atribuindo eventualmente um peso maior ao preço a pagar, em detrimento da sua saúde e das suas necessidades. Este aspeto permite-nos crescer ao nível de técnicas de venda e de aconselhamento enquanto profissionais, mas dificulta simultaneamente a implementação de uma terapêutica totalmente adequada.

3. CASOS PRÁTICOS

3.1. Gripes e constipações

A época do ano em que iniciei o estágio é caracterizada por uma maior afluência de utentes à Farmácia Rodrigues da Silva a fim de procurar soluções para este tipo de problemas de saúde. Neste sentido, tive oportunidade de contatar com utentes com problemas de tosse, ao qual avaliava com este sobre o tipo (tosse seca ou com expetoração). Nesta situação, foi também importante perceber a possibilidade de alguma complicação extra como por exemplo diabetes, que poderia influenciar o tipo de forma farmacêutica de um mucolítico (Fluimucil[®]) a aconselhar (solução oral ou comprimidos). Foi também frequente observar situações de utentes com congestão nasal, ao qual tentei compreender a origem ou problema associado (ex: alergia), a fim de aconselhar um descongestionante nasal comum (Nasorhinathiol[®]) ou indicado para situações de causa alérgica (Flonaze[®]). A par da terapêutica farmacológica, tive a oportunidade de promover a inclusão de medidas não farmacológicas referindo a sua importância na terapêutica, tais como a necessidade de frequentar ambientes quentes e húmidos, reforçar o agasalho individual e a ingestão de líquidos.

3.2. Problemas musculares/articulares

Frequentemente era solicitado pelos utentes aconselhamento para tratamento e alívio sintomático de dores musculares e articulares como entorses ou outras inflamações localizadas. Neste âmbito, procurei perceber a causa do problema (exercício físico excessivo, trauma, etc.) e avaliar a gravidade tendo em conta sempre que possível a observação direta da zona afetada. Consoante estes parâmetros, aconselhei preferencialmente um fármaco anti-inflamatório de administração tópica (Voltaren Emulgel[®]/Voltaren Emulgelex[®]), e em casos em que utente manifestasse sintomas mais marcados ou que assim preferisse, por via oral (Ilgesin[®]).

4. CONCLUSÃO

Ao longo destes 5 anos de frequência do MICF, tive a oportunidade de enriquecer o meu conhecimento teórico, algo que ainda assim se torna insuficiente sem a aplicação prática que corresponde à etapa final de confirmação das minhas aptidões para a profissão. O estágio curricular apresenta-se assim como uma oportunidade única de consolidação da aprendizagem e consciencialização da realidade profissional.

É cada vez mais notório que a Farmácia assume um papel essencial no sistema de saúde, pois acaba por ser o primeiro local de contacto natural pelos utentes, que procuram uma solução imediata para os seus problemas de saúde, aos quais é prestado um serviço importante a nível científico e até social. E é aqui que entra o papel do Farmacêutico, que inevitavelmente serve muitas vezes de primeiro agente de saúde pública, pelo que tem o dever de procurar valorizar-se tendo em conta as suas competências científicas e responsabilidades sociais.

Ao longo do meu estágio na FRS tive hipótese de contactar com todas as áreas de trabalho inerentes ao funcionamento de uma Farmácia de Oficina, e neste âmbito termino o presente relatório realçando todo o planeamento de estágio realizado pela Dr^a Joana Carvalho, que com a colaboração natural da restante equipa, me permitiu adquirir competências sólidas em todas as áreas de trabalho dentro da Farmácia. Concluí o estágio convicto de que todas as etapas foram planeadas, acompanhadas e executadas com critério e tempo perfeitamente adequados, e que me permite afirmar que após este período de estágio me sinto muito mais confiante em relação às minhas aptidões para o exercício da profissão enquanto Farmacêutico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos**. Capítulo III (Deontologia Profissional), Secção I (Direitos e deveres gerais dos farmacêuticos), Artigo 9º (Dever geral)(28 de Março de 1998). 1998.
2. INFARMED I. **Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde**. Versão; 2015.
3. ALVES RP, RAMOS F. **Medicamentos genéricos e sustentabilidade do SNS**. Revista Portuguesa de Farmacoterapia. 2011;3(4):23-34.

Parte II

Monografia Intitulada

**"O Mecanismo Molecular de Efluxo de Fármacos pela
Glicoproteína-P"**

ABREVIATURAS

MDR – Resistência a Múltiplos Medicamentos

ABC – *ATP- Binding Cassette Transporters* (Transportadores de cassete de ligação a ATP)

P-gp – Glicoproteína-P

GSH – Glutathiona

GST – Glutathiona S-transferase

UGT – Uridina Glucuronosiltransferase

SULT – Sulfotransferase

NAT – N-acetiltransferase

NBD – Domínio de Ligação a Nucleótidos

TMD – Domínio Transmembranar

SNP – Polimorfismo de Nucleótido Único

BCRP – Proteína de Resistência ao Cancro de Mama

MRPI – Proteína de Multiresistência I

GC – Glucosilceramida

GCS – Glucosilceramida sintetase

Glucose-UDP – Glucose Uridina-difosfato

LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano

IL – Interleucina

TNF – Fator de Necrose Tumoral

HSE – Elementos de Choque Térmico

RESUMO

A resistência a múltiplos fármacos (MDR) constitui um obstáculo importante na terapêutica farmacológica. Existem vários mecanismos evidenciados como intervenientes em processos de resistência a fármacos, de onde se destacam o metabolismo de fármacos ou lipídico, a evasão à apoptose, modulação de vias de transdução de sinal e a influência das membranas biológicas e transportadores de efluxo.

Embora seja um problema de origem multifatorial, existem evidências de que os transportadores de efluxo assumem um papel de maior importância no desenvolvimento de MDR, onde se evidenciam os transportadores de cassete de ligação à ATP (*ATP- Binding Cassette Transporters*).

Os transportadores ABC têm sido associados ao fenótipo de MDR, constituindo um alvo para o desenvolvimento de novos moduladores de efluxo capazes de diminuir a sua influência na cinética dos fármacos, com vista a reverter situações de MDR.

O estudo particular do mecanismo de ação molecular da glicoproteína-P forneceu alguns aspetos-chave na cinética de fármacos, onde se destaca o papel da membrana plasmática e a regulação constitutiva da expressão, que se revelam capazes de modificar o comportamento dos fármacos e a atividade da bomba de efluxo.

Existem dois modelos propostos para o mecanismo molecular de efluxo da P-gp, o modelo de “aspirador hidrofóbico” (*Vacuum Cleaner*) e o modelo “*Flipase*”, que ainda carecem de confirmação experimental mais aprofundada.

Com vista a ultrapassar a MDR e a obter melhores resultados na prática clínica, têm sido desenvolvidos fármacos inibidores da glicoproteína-P, cujos estudos demonstram alguns resultados maioritariamente *in vitro*.

Esta revisão resume os principais conhecimentos que envolvem o papel da glicoproteína-P na MDR, bem como perspectiva algumas áreas com potencial para desenvolvimento de futuras alternativas terapêuticas.

PALAVRAS-CHAVE

Multiresistências, Transportadores ABC, Glicoproteína-P, Efluxo dependente de ATP, Membrana Plasmática.

ABSTRACT

Multiple drug resistance (MDR) is a major obstacle in pharmacological therapy. There are several mechanisms evidenced as intervenients in drug resistance processes, from which the metabolism of drugs or lipids, evasion to apoptosis, modulation of signal transduction pathways and the influence of biological membranes and efflux transporters are highlighted.

Although it is a multifactorial origin problem, there is evidence that efflux transporters play a major role in the development of MDR, where ATP-Binding Cassette Transporters (ABC) transporters are evidenced.

ABC transporters have been associated with the MDR phenotype, constituting a target for the development of new efflux modulators capable of decreasing their influence on drug kinetics, in order to reverse MDR situations.

The particular study of the mechanism of molecular action of P-glycoprotein provided some key aspects in drug kinetics, in which the role of the plasma membrane and the constitutive regulation of expression are highlighted, which are able to modify the behavior of the drugs and the activity of the efflux pump.

There are two proposed models for the molecular efflux mechanism of P-gp, the "Vacuum Cleaner" model and the "Flipase" model, which still lack further experimental confirmation.

In order to overcome MDR and to obtain better results in clinical practice, P-glycoprotein inhibitor drugs have been developed, whose studies show some results in vitro.

This review summarizes the key knowledge surrounding the role of P-glycoprotein in MDR as well as the prospect of some areas with potential for future therapeutic alternatives.

KEYWORDS

Multidrug Resistance, ABC Transporters, P-glycoprotein, ATP-dependent efflux, Plasmatic Membrane.

I. MULTIRRESISTÊNCIAS

O desenvolvimento de resistência a múltiplos medicamentos (MDR) continua a ser um grande desafio da terapêutica. Este fenómeno pode ser definido como a capacidade que as células expostas a um único fármaco têm para desenvolver resistências a um vasto leque de fármacos estruturalmente e funcionalmente não relacionados (1).

Um exemplo largamente documentado reside na área da terapêutica anticancerígena, em que há evidências de que existe resistência intrínseca ou adquirida aos fármacos eficazes (2). Neste caso, a MDR também pode ser descrita como a capacidade das células tumorais em se tornar simultaneamente resistentes aos efeitos citotóxicos de agentes antitumorais quando utilizados individualmente ou a outros estruturalmente ou farmacologicamente não relacionados, motivo pelo qual a quimioterapia combinada é menos eficaz do que o esperado (3-5). Também existem evidências de que a MDR tem sido associada a um prognóstico mau e a uma taxa de sobrevivência reduzida em vários tipos de tumores sólidos e hematopoiéticos, incluindo cancro gástrico e leucemia (3, 6). Este fenómeno caracteriza-se por uma sensibilidade inicial aos agentes antitumorais na maioria dos casos, no entanto, a aquisição de resistências resulta invariavelmente em recidivas, devido à expansão das populações de células tumorais resistentes (3).

Outro exemplo também já fundamentado está relacionado com a disseminação contínua de bactérias multirresistentes que reduz a eficácia do nosso "arsenal" antibiótico e consequentemente diminui a eficácia terapêutica (7).

Durante a última década, existem informações crescentes sobre o surgimento e disseminação de bactérias Gram-negativas resistentes (7, 8). Está descrito que em bactérias multirresistentes, a sobreexpressão de bombas de efluxo é um dos fatores descritos que contribui para a redução da suscetibilidade aos antibióticos, diminuindo a sua concentração intracelular (7), tornando-se assim importante compreender a base molecular do mecanismo de efluxo que está envolvido na limitação da concentração intracelular dos grupos de fármacos clinicamente utilizados.

Além do aumento do efluxo ativo de antibióticos, alguns mecanismos associados a modificações da permeabilidade da membrana, como a diminuição da captação passiva (afluxo), estão a ser descritos como fatores fundamentais para o desenvolvimento do fenótipo MDR bacteriano (7).

Adicionalmente, existem dados que mencionam um aumento na disseminação hospitalar de estirpes bacterianas que expressam um mecanismo de efluxo que está

envolvido não só na expulsão de vários grupos moleculares de medicamentos antibacterianos, bem como em outros produtos químicos como biocidas, incluindo desinfetantes, antissépticos, esterilizantes e conservantes que são frequentemente utilizados na prática clínica (7).

De uma forma geral, este tipo de resistência pode-se desenvolver por vários mecanismos, incluindo diminuição da absorção de fármacos, ativação de sistemas de desintoxicação, ativação de mecanismos de reparação de DNA, evasão de apoptose induzida por fármacos, e aumento do efluxo de medicamentos (2-5, 9), entre outros descritos mais adiante neste trabalho.

Também existem evidências de que a instabilidade cromossômica provocada por eventos de separação cromossômica espontânea, bem como a predisposição intrínseca em células tumorais, podem contribuir para a aquisição de resistência a múltiplos fármacos *in vitro* e aumentar o risco de resistência antitumoral (5, 9, 10).

Torna-se assim crucial perceber mais aprofundadamente quais os tipos de mecanismos que podem estar envolvidos na gênese da resistência a fármacos, e que resultam na diminuição das características necessárias à sua eficácia terapêutica.

2. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Alguns dos mecanismos já evidenciados como intervenientes em processos de resistência a fármacos podem ser apreciados na Figura 1 (1, 2, 4, 5, 7, 11-13):

Membrana plasmática:

a. *Interação de fármacos com membrana:* Além dos fatores farmacêuticos, o principal obstáculo que evita que um medicamento atinja o compartimento intracelular é a membrana plasmática, isto porque embora os agentes terapêuticos possam reagir com diversas moléculas, têm de se submeter a um processo de entrada nas células por difusão passiva, endocitose ou transporte facilitado (transportadores de absorção).

b. *Ação de transportadores:* a absorção de fármacos pode ser significativamente diminuída por bombas de efluxo de fármaco dependentes de ATP (como os transportadores ABC), RLIP76/RALBPI e ATP7A/B.

Metabolismo Lipídico: as células multirresistentes podem ter alterações no metabolismo lipídico que induzem modificações nas propriedades da bicamada lipídica, influenciando desta

forma a absorção de fármacos. Um dos exemplos é a ceramida, que tem sido estudada quanto ao seu papel como mensageiro celular da apoptose, bem como existem evidências de que esse lípido tem um papel semelhante na regulação da expressão de ABCB1 (P-gp).

Metabolismo de fármacos: uma vez no compartimento intracelular, os fármacos podem sofrer a ação das enzimas do metabolismo, funcionando como uma segunda linha de resistência celular, processo que envolve três fases. A fase I, ou metabolismo oxidativo, é mediada essencialmente por enzimas do complexo citocromo P450 (CYPs) e epóxido hidrolases. As espécies são metabolizadas e convertidas em metabolitos altamente mutagênicos (epóxido) que podem ser posteriormente conjugados por enzimas de fase II, incluindo GSTs, UGTs, SULTs e NATs. Estes metabolitos conjugados podem então ser alvo de efluxo, o que pode ser considerado como fase III do metabolismo do fármaco.

Captção de fármacos: as espécies de fármacos podem ser presas em organelos intracelulares tais como lisossomas e endossomas através do influxo pelos transportadores ATP7A / B, ABCA3 ou ABCB5 e depois expulsas da célula.

Mecanismos ativados após a entrada nuclear: as moléculas farmacológicas (recém-ativadas no caso de uma abordagem terapêutica baseada em pró-fármacos) que evadem os mecanismos de resistência acima indicados podem ainda entrar no núcleo, encontrando vários mecanismos possíveis de resistência. Desde logo podem ser alvo de efluxo através de “vaults” para o citoplasma e posteriormente captadas em vesículas intracelulares ou expulsas por meio de transportadores dependentes de ATP (ABC).

Evasão da apoptose induzida: a interrupção das vias apoptóticas, característica do cancro, constitui um entrave para o sucesso da quimioterapia. Pode ocorrer o bloqueio da apoptose através do efeito inibitório da glicosilceramida, cujos níveis intracelulares podem ser aumentados devido à sobreexpressão do fator de transcrição Sp1 induzida pela ceramida.

Microambiente: a hipóxia sobrerregula a expressão de muitos genes ligados à MDR, como transportadores ABC, genes da família Bcl2, metalotioneína, etc., principalmente através da ativação do fator de transcrição HIF1. Por outro lado, a hipóxia também reduz significativamente a eficácia de agentes antitumorais que requerem oxidação para se tornarem citotóxicos ou aumentam a citotoxicidade de outros agentes que devem sofrer redução para formar espécies citotóxicas ativas. O compartimento extracelular ácido também tem efeitos importantes sobre o sucesso da quimioterapia.

Vias de transdução de sinal: as células tumorais alteram as vias de transdução de sinal.

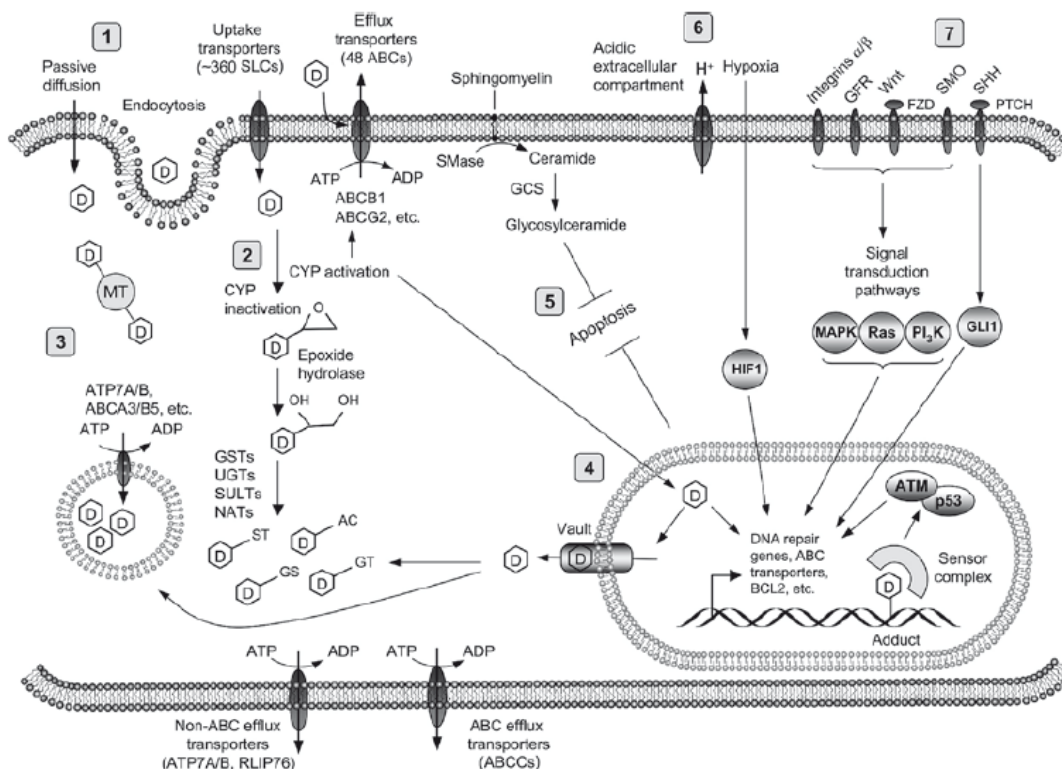


Figura I - Alvos de MDR. 1- Entrada de fármacos. 2- Metabolismo. 3- Sequestração de fármacos. 4- Mecanismos após entrada na célula. 5- Evasão de apoptose induzida. 6- Microambiente. 7- Vias de transdução de sinal (2).

Relativamente ao papel do efluxo de medicamentos como base para o surgimento de MDR, sabe-se que existem diversos tipos de transportadores que podem estar envolvidos na gênese de MDR, em que se enquadram os transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporters*), descritos na secção seguinte, onde existem evidências de que demonstram ser dos mais importantes neste processo (2, 5, 9, 13, 14).

Além dos transportadores ABC, existem outros intervenientes no processo de efluxo de fármacos dependente de ATP, como os transportadores RLIP76 / RALBP1 (15) e ATP7A / B (16). A RLIP76 é uma proteína ativadora de GTPase que medeia o efluxo de conjugados de GSH de agentes antitumorais como melfalano (17) e doxorubicina (18). As ATP7A / B são bombas de efluxo de cobre que parecem ter um papel importante na resistência aos agentes de platina (16, 19).

É, portanto, imperativo que se obtenha uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência a fármacos devido a este tipo de transportadores de efluxo, o que

poderá levar à descoberta de novos alvos terapêuticos e à melhoria das atuais estratégias terapêuticas.

3. TRANSPORTADORES ABC (ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTERS)

A MDR é muitas vezes adquirida pela sobre expressão de proteínas de membrana que atuam como bombas de transporte de fármacos geralmente conduzido pela hidrólise de ATP, mas também por gradientes eletroquímicos iônicos (1, 9, 20). A biodisponibilidade de uma grande variedade de compostos, onde se incluem substâncias endógenas, fármacos e outros xenobióticos, pode ser então influenciada por transportadores de absorção ou de efluxo que intervêm no seu movimento através das membranas biológicas (21).

Nas células humanas (ou nas de mamíferos em geral), existem proteínas capazes de diminuir as concentrações intracelulares de fármacos e comprometer o sucesso terapêutico, que pertencem à superfamília de proteínas de cassete de ligação a ATP (ABC) (1, 22, 23).

A designação "transportadores ABC" foi introduzida em 1992 por Chris Higgins, baseando-se na cassete de ligação a ATP altamente conservada, que corresponde à característica mais importante desta superfamília de proteínas (21, 24). Este tipo de transportadores é universalmente expresso em todos os organismos, desde bactérias e plantas até mamíferos (21, 24). Além da sua expressão fisiológica em tecidos normais, muitos deles estão expressos e, principalmente, amplificados em tumores humanos (5).

A superfamília ABC representa uma das maiores famílias de proteínas de transporte em organismos vivos e os membros desta família desempenham um papel central na fisiologia celular (25). Esta superfamília compreende proteínas que estão envolvidas em diversas funções, incluindo (2, 3, 6, 21, 25-28): regulação da permeabilidade local, expressando-se na barreira hematoencefálica, líquido cefalorraquidiano, barreira hemato-testicular e placenta; no fígado, no trato gastrointestinal e no rim, excretam compostos nocivos, protegendo assim o organismo; também desempenham um papel ativo no sistema imunitário ao transportar péptidos para o retículo endoplasmático que são identificados como antígenos pelas moléculas HLA de classe I (por exemplo, ABCB2/TAP1, ABCB3/TAP2); desempenham papéis fisiológicos no transporte de lípidos celulares e na homeostase; entre outras funções na sinalização celular.

É então expectável que, devido às diversas funções dos genes ABC, as deficiências genéticas associadas à sua mutação também podem variar, conforme o revisto por Borst e Elferink (29).

As proteínas transportadoras de cassete de ligação a ATP (ABC) são uma grande superfamília de proteínas de membrana, que compreendem 48 membros divididos em sete famílias diferentes, de ABCA até ABCG, com base na sequência genética e organização dos seus domínios de ligação a ATP (2-4, 9, 21, 23). O conjunto completo deste tipo de transportadores é descrito em pormenor em alguns trabalhos (9, 21).

A maioria destes genes codifica proteínas de membrana que atuam no transporte dependente de energia de xenobióticos, metabolitos e moléculas de sinalização através das membranas celulares, frequentemente contra o gradiente de concentração (9, 21, 23).

Estas proteínas têm uma alta homologia de sequência entre todos os membros, especialmente dentro de cada família em particular. Os transportadores ABC habitualmente contêm um par de domínios de ligação à ATP, também conhecidos como domínios de ligação a nucleótidos (NBD), localizados no citoplasma, e dois conjuntos de domínios transmembranares (TMD), que contêm 6-12 hélices α que atravessam a membrana (Figura 2a), e que normalmente são responsáveis pela determinação da especificidade do substrato (4, 12, 21).

Os domínios de ligação a nucleótidos ligam-se e hidrolisam ATP, proporcionando assim a energia necessária para, juntamente com mudanças conformacionais conduzidas pela hidrólise de ATP, permitir que a bomba desloque os seus substratos através de membranas biológicas (membrana plasmática, bem como membranas intracelulares do retículo endoplasmático, peroxissomas e mitocôndrias) contra os seus gradientes de concentração, limitando assim a acumulação celular dos seus substratos (Figura 2b) (5, 9, 21, 22).

O NBD contém três sequências conservadas: os motivos Walker A e B, encontrados em todas as proteínas de ligação à ATP e um motivo C, denominado de “assinatura” (sequência LSGGQ), localizado a montante do local Walker B (9, 21). O motivo C é específico para transportadores ABC, distinguindo-os de outras proteínas de ligação a ATP (21).

Estas proteínas bombeiam substratos numa única direção, geralmente para fora do citoplasma e organelos celulares. Para compostos hidrofóbicos, esta movimentação é

frequentemente do folheto interno da bicamada fosfolipídica para a camada externa ou para uma molécula aceitadora (21).

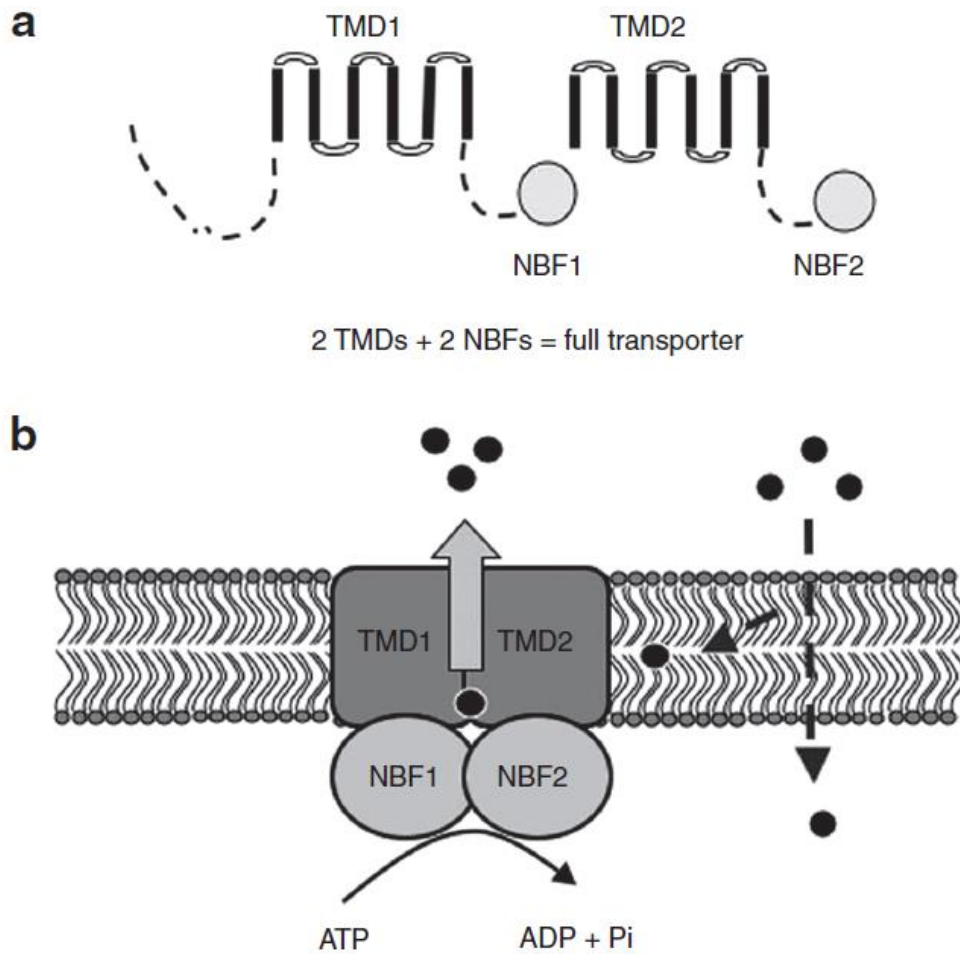


Figura 2 - Organização de transportadores ABC. (a) Organização estrutural de um transportador ABC (completo), contemplando dois TMDs e dois NBDs. (b) Os transportadores ABC são conduzidos pelo ATP, efetuando efluxo de substratos com a energia fornecida pela hidrólise de ATP (9).

A topologia de um transportador ABC descrita anteriormente não é aplicável a todos os membros dessa superfamília de proteínas. De fato, os genes ABC são organizados em transportadores completos, contendo (pelo menos) duas TMDs e dois NBDs, ou transportadores “*half-ABC*” (30), contendo um de cada domínio. Por exemplo, ABCG2 (BCRP) é um transportador “*half-ABC*”, contendo 6 hélices de TMD e um NBD, enquanto ABCB1 (P-gp), ABCC4 (MRP4), ABCC5 (MRP5), ABCC11 (MRP8) e ABCC12 (MRP9) contêm 12 hélices de TMD, divididas em duas metades formando dois TMDs, cada um com um NBD (protótipo de proteínas ABC). A subfamília ABCB é composta por quatro transportadores completos e sete transportadores “*half-ABC*”, sendo a única subfamília humana que tem ambos os tipos de transportadores (21).

Os genes que codificam os transportadores ABC estão amplamente dispersos no genoma e mostram alto grau de identidade da sequência de aminoácidos entre eucariotas (31). No entanto, os transportadores ABC mostram ampla variabilidade interindividual na sua expressão. Por exemplo, a expressão interindividual de P-gp variou entre 20-55 vezes no fígado humano e 3-6 vezes no intestino delgado (32).

Alguns estudos recentes revelaram alta frequência de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) em genes que codificam esta classe de transportadores de membrana. Curiosamente, algumas das variações genéticas detetadas em genes ABC foram associadas a efeitos quantitativos (atividade de transporte alterada) ou mesmo qualitativos (espectro alterado de substratos) (6).

Desta superfamília de transportadores, tem sido demonstrado que cerca de 10 a 20 estarão envolvidos na resistência a fármacos (2, 3, 5, 21, 23). Atualmente, existem evidências que indiciam o envolvimento principal de três destes transportadores de efluxo dependentes de ATP na resistência a fármacos: *ABCB1* (glicoproteína-P / P-gp / MDRI), *ABCG2* (Proteína de Resistência ao Cancro de Mama /BCRP) e *ABCC1* (Multidrug Resistance Protein I / MRPI) (2, 3, 21, 23, 33).

Embora a P-gp e os outros transportadores com ela relacionados reduzam a concentração intracelular de fármacos através do efluxo dependente de ATP, eles possuem propriedades distintas. Por exemplo, o MRPI, mas não o MDRI, transporta fármacos naturais carregados negativamente (34), enquanto que o transportador *ABCG2/BCRP* interage com o grupo heme e outras porfirinas mimetizando as estratégias de defesa dos tecidos pelas bombas de efluxo (35), que são capazes de transportar compostos tóxicos (catiônicos, aniônicos, neutros), agentes carcinogénicos ambientais, metais, pesticidas e produtos de peroxidação lipídica (11).

O primeiro transportador de fármacos clonado foi a P-gp, sendo considerada como um protótipo para a compreensão dos seus mecanismos bioquímicos (25). Além disso, a P-gp é a proteína melhor caracterizada da superfamília dos transportadores ABC devido, em parte, ao seu papel significativo ao conferir um fenótipo de MDR em células tumorais que adquiriram resistência à quimioterapia (21).

Durante várias décadas, a inibição de P-gp atraiu muitos esforços de pesquisa significativos na tentativa de superar a resistência a múltiplos medicamentos (21), tornando-se assim crucial compreender toda a influência que este transportador pode ter na eficácia farmacológica.

4. P-GP (GLICOPROTEÍNA-P)

A Glicoproteína-P foi descoberta em 1976 (21, 36) em células de ovário de hamster chinês selecionadas para resistência à colchicina, em que os autores também descobriram que essas células apresentavam resistência a uma variedade de fármacos estruturalmente e funcionalmente não relacionados, além da colchicina (36), sendo que, posteriormente, mostrou conferir MDR em células sensíveis aos fármacos (37).

4.1. ESTRUTURA, DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS E FUNÇÃO DA P-GP (ABCB1)

A P-gp consiste num único polipéptido de 170 kDa composto por 1280 aminoácidos organizados em duas repetições sucessivas de 610 aminoácidos unidos por uma região de ligação de 60 aminoácidos (4, 6, 9, 21, 38). A proteína é sintetizada e glicosilada no retículo endoplasmático, obtendo-se como um intermediário de peso molecular de 150 kDa. Posteriormente, a fração glicídica é modificada no aparelho de Golgi antes da exportação para a superfície celular (39). Em humanos, a P-gp é codificada por dois genes de resistência a múltiplos fármacos, MDR1/ABCB1 e MDR3/ABCB4 (também designado MDR2), que surgiram de um evento de duplicação e estão localizados um ao lado do outro no braço longo do cromossoma 7 (7q21) (9, 21). O fenótipo de MDR está associado à isoforma MDR1 (40). Além disso, uma vez que ambas as isoformas compartilham 78% da identidade da sequência de aminoácidos, sugeriu-se que elas possam apresentar estruturas e mecanismos de ação semelhantes (41).

Conforme mencionado anteriormente, a proteína parece ter surgido por um evento de duplicação de genes, ao fundir duas metades homólogas, cada uma constituída por seis segmentos transmembranares e dois NBD no lado citosólico, onde o ATP se liga e é hidrolisado (Figura 3A) (21, 33, 38, 41).

As duas meias-moléculas são separadas por uma "região de ligação" (*linker*) citoplasmática altamente carregada, que é fosforilada em vários locais pela proteína quinase C (PKC) (42). Os TMD formam a via através da qual os compostos atravessam a membrana e os terminais NH₂ e COOH, bem como os NBDs, estão localizados intracelularmente, estando o primeiro *loop* extracelular N-glicosilado (43). É possível também afirmar que a ligação de nucleótidos aos transportadores ABC é conduzida pela dimerização dos NBDs (44), o que é essencial para o transporte conduzido por ATP (21, 33).

As estruturas de cristal de raios X de vários NBD isolados de proteínas ABC bacterianas mostraram um arranjo interdigitado de cabeça para cauda, o chamado dímero

“sanduíche” (33, 41). Duas moléculas de ATP ligam-se na interface do dímero “sanduíche”, e cada uma interage com os motivos Walker A e B de um NBD e com o motivo C do domínio parceiro (6, 33, 41). Estes dímeros simétricos estáveis só se observam quando os domínios NB estão num estado inativo devido a mutação de um resíduo de aminoácido essencial para a catálise, ou na ausência de Mg^{2+} (33).

As primeiras estruturas de cristal de raios X de P-gp de rato numa conformação voltada para o interior apareceram em 2009, apresentando uma bolsa de ligação (“*binding pocket*”) ao fármaco dentro das regiões TM da proteína (45). Esta grande cavidade flexível é constituída por dois feixes de seis hélices, cada um composto de porções de ambas as metades N e C-terminais (Figura 3B). Este fenómeno, conhecido como troca de domínios, também foi descrito para outros exportadores de ABC. A região de ligação ao fármaco é parcialmente alinhada com resíduos aromáticos e hidrofóbicos, sugerindo que permitem ligar substratos através de interações hidrofóbicas e Van der Waals. No caso do péptido cíclico QZ59-SSS, diferentes estereoisómeros deste substrato são mantidos em diferentes sublocais por um conjunto único de interações, e duas moléculas deste mesmo substrato podem caber na cavidade simultaneamente, através de diferentes conjuntos de interações (Figuras 3C, D). A presença de sublocais sobrepostos dentro da cavidade ajuda a explicar a extraordinária gama de estruturas químicas que interagem com a P-gp (33).

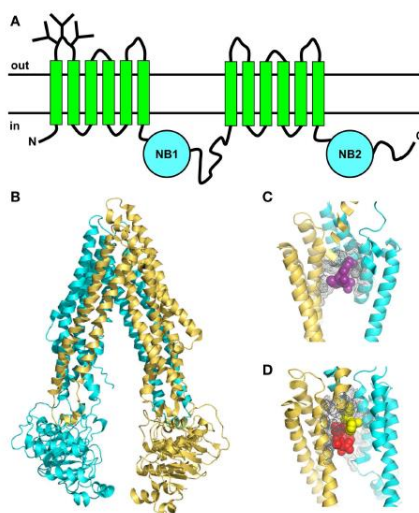


Figura 3 - Topologia e estruturas cristalinas de raios-X de P-gp. (A) Duas metades homólogas, cada uma com seis segmentos TM e um domínio NB no lado citoplasmático. (B) conformação voltada para o interior. (C) Vista de close-up (resolução 4.4 Å) de uma molécula de QZ59-RRR (magenta) que ocupa o local dentro da cavidade de ligação ao fármaco, com os volumes de cadeias laterais próximas em cinza. (D) Duas moléculas de QZ59-SSS ocupando os locais superior e inferior (amarelo e vermelho, respetivamente) dentro da cavidade de ligação ao fármaco (33).

4.2. DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS E FUNÇÃO FISIOLÓGICA (21)

A expressão de P-gp foi descrita em muitos tecidos e células cultivadas de origem humana e de outros mamíferos (21), exibindo uma alta identidade de sequência (87%) com a P-gp em ratinhos por exemplo (23, 46). A maior expressão desta bomba de efluxo foi descrita na superfície apical de muitos tipos de células secretoras, sugerindo-se que a bomba exerça o seu papel fisiológico na eliminação de metabolitos endógenos ou xenobióticos para fora das células (38, 41, 47). Por exemplo, a P-gp é um dos principais determinantes da excreção de catiões na vesícula biliar (48), sendo que também foi encontrada nos dutos pancreáticos, glândula adrenal, placenta, testículos (barreira hemato-testicular) e na membrana apical de células endoteliais que revestem os capilares do cérebro (barreira hematoencefálica), células que impedem que os componentes do sangue atravessem o sistema nervoso central (4, 6, 41, 49). Na verdade, nestas células, a P-gp constitui um fator importante na limitação da entrada dos seus substratos no cérebro, uma vez que a proteína foi encontrada orientada nessas células para transportar substratos em direção ao sangue (21, 41). Consequentemente, o principal papel da P-gp nas barreiras do sangue e do tecido sanguíneo é provavelmente a proteção desses órgãos relativamente a compostos tóxicos que entram no sistema circulatório. Além disso, foram identificados níveis elevados de expressão de P-gp na placenta (4, 41, 50), onde aparece para desempenhar um papel central na proteção do feto (51).

4.3. MECANISMOS DE AÇÃO POSSÍVEIS PELA P-GP

Vários modelos foram apresentados tendo em conta os dados experimentais disponíveis, dos quais são hoje mais aceites os modelos de "aspirador hidrofóbico" (*Vacuum Cleaner*) e "Flipase" (Figura 4) (21, 33, 40).

4.3.1. MODELO "VACUUM CLEANER"

A P-gp transporta tipicamente compostos lipofílicos, que acabam por se acumular dentro da bicamada lipídica. Estes compostos também são geralmente moléculas anfipáticas e, em vez de se distribuir uniformemente no núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica, alinham-se na região interfacial. Um estudo de RMN de sete substratos e dois moduladores de P-gp confirmou que este é o caso (52).

O consenso geral do modelo "aspirador hidrofóbico de vácuo" baseia-se no princípio de que a P-gp reconhece compostos hidrofóbicos inseridos no folheto interno da membrana

plasmática (após se terem distribuído pela bicamada) e expulsa-os da membrana diretamente para o meio aquoso externo (53).

Esta ação de bombeamento origina um gradiente de concentração em toda a membrana plasmática, com maior concentração de fármaco na fase aquosa externa (49), sendo que a P-gp é capaz de intercetar substratos antes de entrarem no citosol, protegendo assim a célula da exposição a moléculas potencialmente tóxicas (49).

4.3.2. MODELO “FLIPASE”

A proposta alternativa, o modelo "flipase", supõe que os substratos da P-gp são lançados do folheto interno da bicamada lipídica para o folheto externo da membrana, (Figura 4), exigindo assim que os substratos tenham uma localização específica dentro de cada folheto da bicamada, em vez de se distribuírem aleatoriamente pelo núcleo hidrofóbico da membrana (53).

De acordo com este modelo, também é necessária uma baixa taxa de movimento espontâneo de substratos entre as camadas da membrana lipídica para permitir que a P-gp gire um gradiente de concentração de fármaco (54).

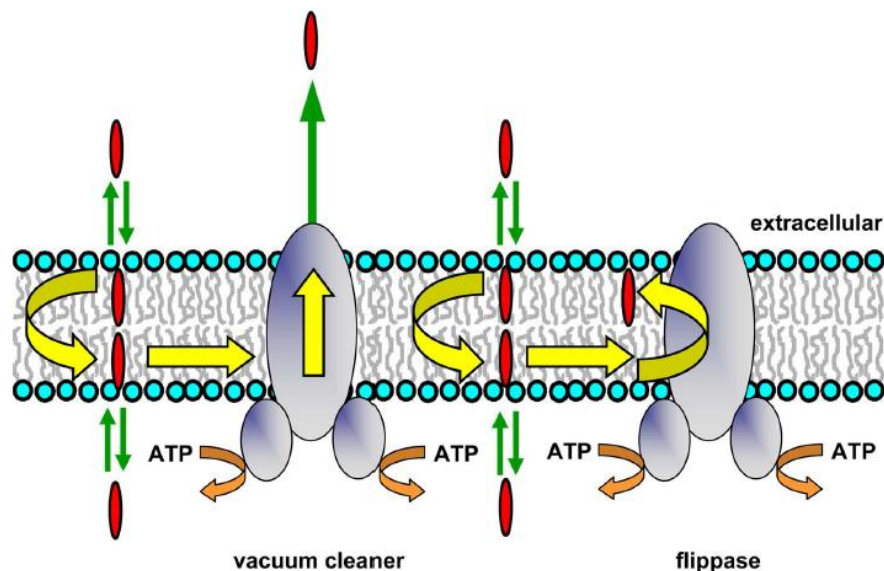


Figura 4 - Modelos de função da P-gp. No modelo de “aspirador hidrofóbico”, os substratos translocam espontaneamente para o folheto citoplasmático e obtêm acesso à cavidade de ligação à P-gp dentro do interior da bicamada, sofrendo posteriormente efluxo para a fase aquosa extracelular. No modelo “flipase”, os fármacos na membrana translocam espontaneamente para o folheto interno, interagem com o local de ligação da P-gp, e depois são virados para o folheto membranal externo (33).

Note-se que ambos os modelos sugerem que os substratos da P-gp se translocam para a fase lipídica antes de interagir com a proteína, o que pode ajudar a explicar a especificidade excepcionalmente vasta dos substratos para a P-gp, uma vez que o determinante primário da especificidade seria a capacidade de um substrato para inserir adequadamente na bicamada lipídica, sendo a interação subsequente com o local de ligação do substrato de importância secundária (40). Além disso, os dados bioquímicos e estruturais indicam que a cavidade de ligação ao substrato está localizada dentro das regiões transmembranares da proteína que contatam com o folheto da membrana citoplasmática (45, 55), o que é consistente com a atuação como "aspirador de pó" ou "flipase". No entanto, experimentalmente têm sido observadas dificuldades de distinção entre os modelos de "aspirador hidrofóbico" e "flipase" (21, 40).

4.4. ALTERAÇÕES DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DA P-GP

Uma das alterações bioquímicas mais consistentes na resistência aos medicamentos é a sobreexpressão da P-gp (12).

Existem dados que demonstraram que a glucosilceramida (GC) influencia a expressão de MDRI, e que a sua inibição suprime a expressão do gene de resistência (12). A formação de GC é catalisada pela glucosilceramida sintetase (GCS), que utiliza a ceramida e a glucose-UDP como reagentes (12). Alguns autores demonstraram que a introdução de um inibidor de GCS para células suplementadas com ceramidas eliminou a expressão aumentada de MDRI, sugerindo que a GC influencia a expressão de MDRI. Essas experiências mostram que altos níveis de ceramida e GC aumentam a expressão do fenótipo de resistência a múltiplos fármacos em células cancerígenas e, portanto, o papel da ceramida como mensageiro da resposta citotóxica pode estar ligado a esta via de resistência (11, 12).

Paralelamente, foi sugerido que o principal mediador da resposta à hipoxia, o fator de transcrição HIF1, também induz a expressão de ABCBI (56), e que estímulos endógenos, como acidose, formação de radicais livres ou privação de glucose também podem induzir sua expressão através de múltiplos caminhos de transdução de sinal (57).

4.5. CARACTERÍSTICAS RESPONSÁVEIS PELA AFINIDADE A SUBSTRATOS/INIBIDORES

4.5.1. FLUIDEZ DA MEMBRANA PLASMÁTICA

Tornou-se evidente há algum tempo que a membrana do hospedeiro desempenha um papel central na MDR mediado pela P-gp, e a complexidade desse relacionamento tornou-se mais evidente à medida que o conhecimento sobre proteína avançou (33). É importante entender como a função da P-gp é modulada pelas propriedades da membrana, pois isso pode influenciar a atividade do transportador.

O transporte de fármacos mediado por P-gp é altamente afetado pela fluidez da membrana. Existem evidências já descritas de que o aumento da fluidez pelo álcool benzílico, um conhecido fluidizador de membrana, reduz o transporte mediado por P-gp (1, 58). Esses estudos sugerem que os fluidizadores de membrana podem reverter a MDR interferindo na capacidade de efluxo da P-gp (33).

Clay *et al.* e Peetla *et al.* confirmaram também a tese de que a função da P-gp depende da conformação lipídica e das características hidrofóbicas da bicamada de fosfolípidos quando o fármaco e a P-gp interagem, na medida em que há mais atração quando a membrana está na fase de gel do que quando está na fase líquida (59, 60).

Outra característica da membrana lipídica que pode modular a atividade da P-gp está relacionada com o papel do colesterol, embora existam estudos dissonantes sobre a afinidade de ligação de fármacos à P-gp em ambientes enriquecidos com este. Por um lado, sugeriu-se que a presença de colesterol em proteolipossomas reconstituídos aumentava a afinidade de ligação de P-gp para fármacos com uma pequena massa molecular (61). No entanto, é igualmente reportado que, por exemplo, a vimblastina mostrou uma grande redução na afinidade de ligação em níveis elevados de colesterol na bicamada, enquanto a daunorrubicina mostrou pouca alteração na afinidade, não sendo por isso associada qualquer relação entre o tamanho do fármaco e o efeito de Colesterol na afinidade de ligação (62).

4.5.2. HIDROFOBICIDADE

Como já referido, a maioria dos substratos de P-gp são de natureza hidrofóbica (4, 33), sugerindo que o aumento da hidrofobicidade favorece a afinidade para a proteína. Neste âmbito, existem evidências que mostram que a lipofilicidade e o número de ligações de hidrogénio são os principais determinantes para a interação com a P-gp, e a partição na membrana lipídica é o passo cinético limitante para essas interações (63).

4.5.3. CARÁCTER ANFIFÍLICO DO SUBSTRATO

A área superficial e as características anfifílicas do substrato também parecem desempenhar um papel significativo na determinação da atividade de ATPase associada à P-gp (64).

Muitos substratos de P-gp e ABCG2 apresentam coeficientes de partição na bicamada lipídica altos (K_{lip}) (54). A constante de dissociação, K_d , para a ligação do substrato aquoso à bomba de fármaco (que pode ser entendida como uma afinidade de ligação aparente) representa, portanto, a conjugação de dois processos: partição do substrato na bicamada lipídica (K_{lip}) e subsequente ligação do substrato ao transportador dentro da bicamada (K_{dlip} , Figura 5). Para P-gp e ABCG2, cujos substratos provavelmente se ligam a partir da membrana, a concentração de fármaco que o transportador realmente "vê" é de ordem de grandeza maior do que a concentração aquosa (Figura 5). A afinidade intrínseca de ligação de fármacos a estes transportadores pode ser calculada como $K_{dlip} = K_d \times K_{lip}$ (Figura 5) e, portanto, pode ser bastante baixa. A afinidade de ligação aparente mais alta foi observada para substratos que tiveram a maior partição para lípidos (54), confirmando a importância já referida deste processo.

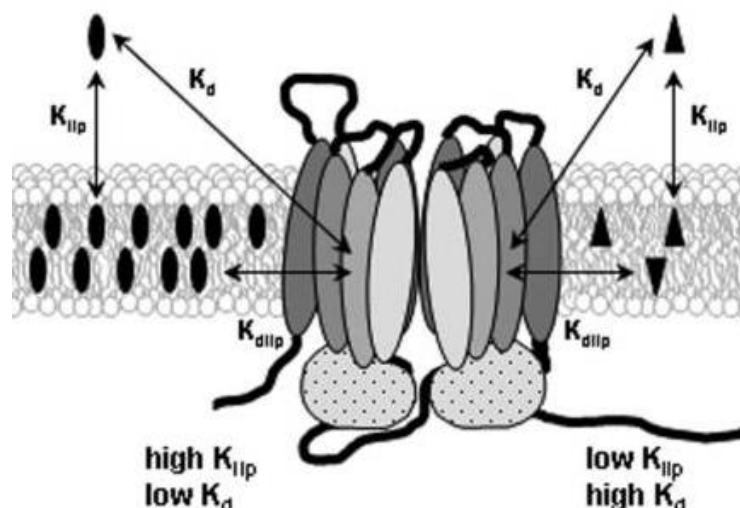


Figura 5 - Ligação do substrato a bombas de efluxo dentro da membrana (54).

5. REGULAÇÃO CONSTITUTIVA DA EXPRESSÃO

5.1. CO-REGULAÇÃO COM OUTROS TRANSPORTADORES ABC

In vitro, demonstrou-se que a dexametasona aumenta a expressão e a atividade de múltiplos transportadores de resistência a fármacos na barreira hematoencefálica de rato

(65). Neste estudo, o tratamento de células endoteliais microvasculares cerebrais com dexametasona induziu significativamente vários transportadores de efluxo de fármacos, incluindo a P-gp e BCRP, indução que se revelou nos níveis de proteína, mRNA e atividade funcional (65).

Por outro lado, mostrou-se que *in vivo* a administração repetida de amiodarona a ratos conduziu a aumentos significativos na expressão renal de P-gp e MRP2, que foram acompanhados pelos correspondentes aumentos na depuração renal dos seus substratos, como a bilirrubina conjugada endógena. No fígado, apenas a expressão de P-gp foi aumentada e foi associada ao aumento da eliminação biliar da amiodarona. Portanto, estes resultados sugerem que a amiodarona pode simultaneamente aumentar a expressão de mais de um transportador ABC, o que também pode contribuir para a variabilidade na sua farmacocinética e na farmacocinética de fármacos administrados simultaneamente (66).

5.2. CO-REGULAÇÃO COM EXPRESSÃO DE CYP 450

Como supramencionado, a P-gp é expressa em células de tecidos com funções secretoras, bem como em barreiras de tecido sanguíneo, tendo, portanto, uma grande influência na absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de xenobióticos. Daqui se pode inferir que a P-gp está implicada em potenciais interações medicamentosas farmacocinéticas. No entanto, o metabolismo e a eliminação de xenobióticos também envolvem reações enzimáticas de fase I (principalmente envolvendo CYP P450) e enzimas conjugadas de fase II, onde a subfamília CYP3A é reportada como uma das mais importantes (21).

Em suma, foi proposta a hipótese da existência de que existe um mecanismo de expressão para uma enzima metabolizadora e um transportador de efluxo para garantir a desintoxicação e eliminação de fármacos, respetivamente, que funciona como uma proteção coordenada contra inúmeros xenobióticos (57).

5.3. INDUZIDA POR STRESS

Em relação à ativação induzida por *stress* da transcrição de hMDR1, sugeriu-se desde os primeiros estudos de função e regulação que a P-gp é de fato um "gene de resposta ao *stress*", pois a sua atividade pode ser modulada pelas condições ambientais, respondendo fortemente a esses sinais de *stress* (67). Deste modo, a rápida regulação do transportador de

múltiplos fármacos por *stress* extracelular e intracelular protege a célula contra uma multiplicidade de fenômenos adversos, incluindo choque térmico, inflamação, fármacos antitumorais e radiação X e UV (21, 67, 68).

5.3.1. INFLAMAÇÃO

A expressão de transportadores de fármacos durante a inflamação também foi avaliada, principalmente em modelos de roedores (68). Demonstrou-se que, em resposta ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), utilizado como simulador de uma resposta de fase aguda *in vivo*, os macrófagos libertam citocinas inflamatórias como interleucina (IL) -1, IL-6 e TNF- α , que, por sua vez, atuam no fígado induzindo uma mudança na expressão gênica, resultando assim na síntese de uma gama de proteínas de fase aguda, bem como de P-gp (69).

5.3.2. QUIMIOTERAPIA

A quimioterapia e radioterapia podem também levar à sobre regulação de MDRI *in vivo* (57). O aumento da expressão de MDRI em resposta a fármacos antitumorais foi relatado pela primeira vez em células que apresentaram um aumento do nível de RNA de MDRI após exposição de curto prazo à actinomicina D, sendo esse aumento mediado, pelo menos em parte, ao nível da transcrição (70). Conseqüentemente, a descoberta de que a expressão do gene MDRI poderia ser induzida por exposição transitória a anti tumorais ganhou potencial significado clínico e, portanto, motivou o desenvolvimento de inibidores P-gp altamente específicos, explicados mais adiante na secção 6, na tentativa de superar o fenômeno MDR (21).

5.3.3. HEAT-SHOCK

O choque térmico é outro fator que pode ser reportado como causa de um aumento na transcrição do gene hMDRI (12, 21). De fato, várias sequências de elementos de choque térmico (HSE) foram identificadas no promotor de hMDRI, reforçando assim a ideia de que pode ser considerado um gene de *stress* (71). Além disso, há evidências de que uma baixa regulação da expressão de MDRI ocorre por inibição da proteína quinase A (PKA) (72, 73),

que liga e ativa o fator de transcrição de choque térmico I (HSF-1) (74), apoiando assim o papel desse fator de transcrição na regulação da expressão de P-gp (21).

5.3.4. RADIAÇÃO IONIZANTE

Shareef *et al.* (2008) avaliaram a ativação induzida pelo estresse do promotor MDRI em resposta a diferentes doses de radiação ionizante, concluindo que existe evidência da diminuição de indução da expressão da P-gp pela LDFRT (*Low-dose fractionated radiation therapy*), que tem implicações importantes na terapia combinatória de cancro, funcionando como adjuvante para quimioterapia (75).

Estudos mais recentes demonstraram ativação transcricional do gene MDRI por radiação UV, demonstrada por algumas modificações pós-traducionais em alguns fatores de transcrição que, podem ativar o gene de MDRI (76).

6. INDUÇÃO OU INIBIÇÃO DA P-GP COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA

6.1. MECANISMOS DE INDUÇÃO E INDUTORES / “ATIVADORES DA P-GP”

Existem alguns mecanismos evidenciados como responsáveis pela indução da atividade da P-gp. Há evidências que mostram que o “*cross-linking*” da região central de NBD1 e NBD2 (próximo do local LSGGQ) perto da região N-terminal (perto do local Walker A) induz uma ativação forte da atividade ATPase da P-gp (77). Este tipo de “*cross-linking*”, que pode ser causado por mutações ou até por ligação de um substrato, pode aumentar a probabilidade de gerar uma conformação de “sanduíche” ligada a ATP para ativar a atividade da ATPase (77).

Por outro lado, existem também dados que indicam que a ativação da indução de P-gp mediada por PXR (*Pregnane X Receptor* – Recetor X de Pregnano) pode estar subjacente ao desenvolvimento da resistência adquirida. PXR consiste numa proteína que é co-expressa com a P-gp em tecidos barreira importantes, como os intestinos e o fígado, e que já foi reportada em interações medicamentosas como resultado da indução da P-gp mediada por esta (78). Por exemplo, a ingestão de hipericão, que contém a hiperforina (agonista de PXR), por voluntários saudáveis resultou num aumento de 1,9 vezes na depuração oral da fexofenadina (substrato da P-gp) (79), enquanto o pré-tratamento com rifampicina resultou num aumento de 1,3 a 5,3 vezes da depuração oral desta (80). Da mesma forma, medicamentos anticancerígenos que ativam a PXR podem afetar a sua própria

farmacocinética, mas também a de outros fármacos administrados concomitantemente (anticancerígenos), como reportado nos estudos de Chen *et al.* (81) e Gupta *et al.* (82), que mostraram que a ativação da PXR pode promover o fenótipo de resistência a múltiplos fármacos de linhas celulares de cancro de próstata e ovário, respetivamente. (78).

6.2. MECANISMOS DE INIBIÇÃO E INIBIDORES

A inibição desta bomba de efluxo é feita principalmente a fim de melhorar o perfil farmacocinético de agentes terapêuticos. Em geral, está descrito que a P-gp pode ser inibida por três mecanismos: (i) bloqueando o local de ligação ao fármaco de forma competitiva, não competitiva (Figura 6) ou alostericamente; (ii) interferindo com a hidrólise de ATP; e (iii) alterando a integridade lipídica das membranas celulares (21, 83).

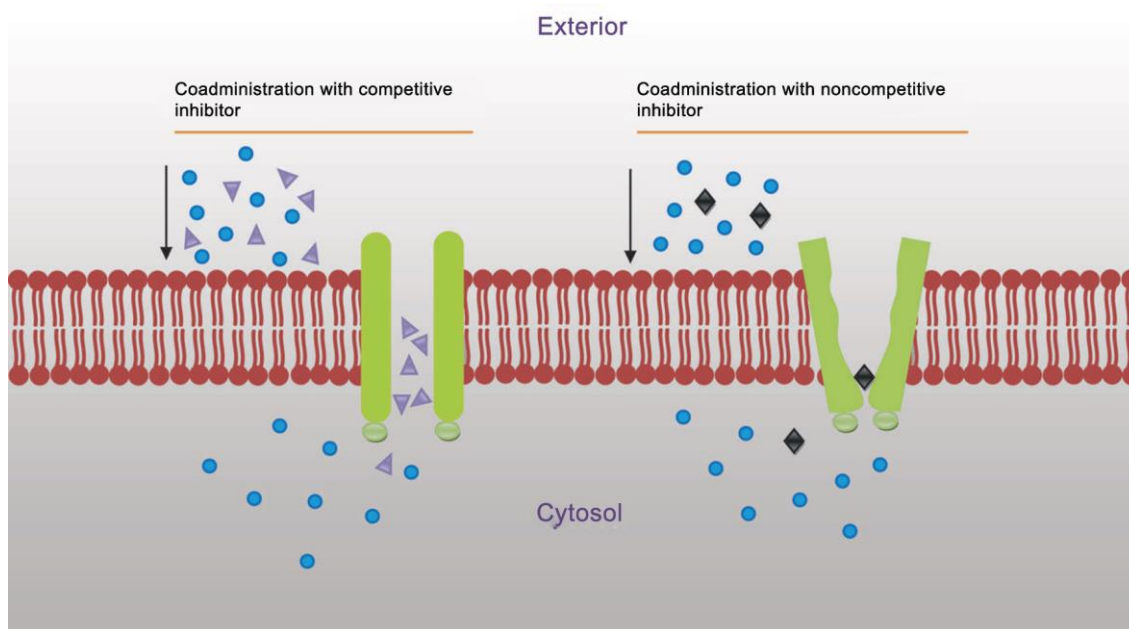


Figura 6 - Inibição da glicoproteína-P para prevenir o efluxo do fármaco (83).

O verapamil e a ciclosporina A são os representantes mais importantes da primeira geração de inibidores da P-gp, que têm o inconveniente de necessitarem de ser administrados em altas concentrações para produzir um efeito terapêutico, levando conseqüentemente à ocorrência de efeitos adversos e problemas de toxicidade (84).

Outras substâncias que atuam como inibidores da P-gp são bloqueadores dos canais de cálcio (diltiazem, nicardipina, felodipina), antagonistas dos recetores da dopamina (clorpromazina, proclorperazina), antagonistas da calmodulina (trifluoperazina, fentizol) e

alcalóides do indol (reserpina, cloroquina, quinina), todos eles com múltiplos efeitos adversos, nomeadamente cardiovasculares e imunossupressores, entre outros (85).

A segunda geração de inibidores de P-gp destacou-se pela vantagem de apresentar menor citotoxicidade. Este grupo é formado por exemplo por dexverapamil, dofequidar fumarato e valsopodar. São compostos que não apresentam especificidade pelo substrato, sendo que também interferem com outras proteínas ABC e enzimas do metabolismo do fármaco (84, 85).

A última geração de inibidores de P-gp, que se encontra atualmente em estudo, compreende, entre outros, zosuquidar, elacridar, e tariquidar (84). Os ensaios clínicos de elacridar e tariquidar mostraram que ambos são inibidores não competitivos e não transportados da P-gp e da BCRP (86). O elacridar foi estudado *in vitro* e *in vivo* como agente de reversão de MDR, evidenciando que quando co-administrado com substratos P-gp, melhora a absorção oral de alguns agentes antitumorais (topotecano e paclitaxel) e evita o efluxo dos substratos (87). O tariquidar é um derivado da dicetopiperazina que, embora tenha um local de ligação ainda desconhecido, demonstrou ter efeitos de reversão de MDR. Além disso, Weider *et al.* confirmaram que o tariquidar é um inibidor da P-gp humana e do rato, e não um substrato da P-gp, e que a sua concentração cerebral é explicada pela sua ligação de alta afinidade à P-gp (88). Embora estes fármacos sejam inibidores potentes e específicos da P-gp, a sua eficácia é limitada pela ligação não específica na barreira hematoencefálica e no trato gastrointestinal, que pode levar à interação com outros compostos e conduzir a problemas de toxicidade (89).

O tri-cloridrato de zosuquidar é um modulador da P-gp altamente seletivo e potente, que se liga de forma alostérica à P-gp e inativa a função de efluxo. O mecanismo específico de inibição deste composto não é claro, embora seja descrito que não afeta outros transportadores. Um perfil de segurança aceitável foi confirmado em ensaios de fase I, apresentando efeitos adversos e toxicidade essencialmente de natureza neurológica (90, 91).

A capacidade de administrar estes moduladores de 3ª geração em conjunto com fármacos antitumorais permanece incerta, no entanto, o seu perfil de toxicidade demonstra ser mais aceitável do que os medicamentos de gerações anteriores (85). A principal limitação da administração destes inibidores é a barreira hematoencefálica, que expressa vários transportadores de fármacos (92).

W6 é um novo derivado de tetrandrina, sendo pesquisado como um inibidor de P-gp. Produz um efeito de reversão favorável em células MDR, aumentando a acumulação

intracelular de doxorubicina em linhas celulares KB com sobreexpressão de P-gp, enquanto também mostra a inibição da atividade ATPase da P-gp (93).

6.3. INIBIDORES DA P-GP DE ORIGEM NATURAL

Abdallah *et al.* (85) descrevem diferentes inibidores de P-gp de origem natural como flavonóides (epigallocatequina-3-galato, baicaleína, silimarina), stilbenos (raloxifeno, cumarinas, cididina, furanocumarina), terpenóides, alcalóides e saponóides, compostos que, *in vitro*, são capazes de inibir competitivamente a ligação e o efluxo de fármacos por P-gp (84, 94).

Munoz-Martinez *et al.* reportam que sesquiterpenos derivados de *Celastraceae* podem atuar na reversão de MDR, através de uma ação intracelular, pela inibição da P-gp nas vesículas da membrana do aparelho de Golgi e do retículo endoplasmático (95).

Nerium oleander é uma planta que exhibe propriedades como agente anti nocicetivo, anti-inflamatório, antibacteriano e anticancerígeno; os compostos de cardenólidos extraídos desta planta demonstraram inibir a P-gp, revertendo a MDR em linhas celulares de carcinoma de ovário (96).

Outro composto semi-sintético deriva da planta *Taxus cuspidata*, um taxóide chamado Taxuspine X (que aumenta a concentração intracelular de Vincristina em algumas células com MDR) que envolve uma produção dispendiosa, motivo pelo qual Castagnolo *et al.* estudaram compostos de taxanos não naturais tais como taxano carboxílico 6 e 7, que também exibiram efeitos inibitórios da P-gp (97).

7. CONCLUSÃO

Ao longo deste trabalho, foi possível demonstrar alguns aspectos relacionados com a glicoproteína-P que podem ser pontos-chave para futuras investigações no ramo da terapêutica farmacológica, com vista a ultrapassar a barreira de resistência a múltiplos medicamentos (MDR).

De fato, a MDR foi revertida com sucesso *in vitro* simplesmente alterando as características biofísicas da membrana (98). Alterar as propriedades da membrana pode, portanto, ser uma abordagem útil para a reversão clínica da MDR, proporcionando abordagens adicionais para o desenvolvimento de novos fármacos, nomeadamente antitumorais, e moduladores com maior eficácia clínica (33).

A relação entre a partição da membrana e a afinidade de ligação dos substratos de P-gp também sugere uma via de redução ou contorno da resistência aos fármacos. Se um medicamento pode ser modificado quimicamente para reduzir a lipofilicidade, será então possível reduzir a capacidade da P-gp para transportá-lo. Isso permitiria que o fármaco atingisse os seus alvos intracelulares e, conduzisse a uma maior eficácia clínica (54).

Os resultados demonstram também que mais de um transportador ABC pode ser induzido. No entanto, é importante ter em mente que a maioria dos estudos descritos até o momento foram realizados *in vitro*, utilizando células cultivadas e, conseqüentemente, não é totalmente garantido que esses resultados envolvendo a indução de transportadores ABC se traduzam em resultados semelhantes numa experiência *in vivo* e, mais importante, na prática clínica (21).

Outro campo interessante no que respeita a mecanismos de MDR reside na relação entre os transportadores de efluxo e enzimas metabólicas. Existe a tese que supõe que CYP3A e MDRI podem trabalhar em conjunto para limitar ou modificar a biodisponibilidade de uma vasta gama de fármacos e xenobióticos. Desta forma, o desenvolvimento de indutores duais (ou duplos indutores) pode constituir uma nova e mais eficaz alternativa terapêutica contra substratos de P-gp tóxicos que são também desintoxicados através do metabolismo catalisado por CYP3A (21).

Concluindo, a área de estudo de alternativas terapêuticas que vençam a resistência a múltiplos fármacos continua a apresentar um potencial relativamente vasto, onde se incluem como alvos os transportadores de efluxo, e em particular, a glicoproteína-P. Será interessante continuar a investigação sobre todas as características e influências que esta proteína tem ou pode ter na eficácia farmacológica, podendo-se traduzir em avanços nos resultados da prática clínica.

8. BIBLIOGRAFIA

1. HENDRICH A, MICHALAK K. **Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells.** *Current drug targets.* 2003;4(1):23-30.
2. GILLET J-P, GOTTESMAN MM. **Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer.** In: Zhou J, editor. *Multi-Drug Resistance in Cancer.* Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 47-76.
3. ZHANG D, FAN D. **Multidrug resistance in gastric cancer: recent research advances and ongoing therapeutic challenges. Expert review of anticancer therapy.** 2007;7(10):1369-78.
4. BINKHATHLAN Z, LAVASANIFAR A. **P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives.** *Current cancer drug targets.* 2013;13(3):326-46.
5. COLEY HM. **Overcoming multidrug resistance in cancer: clinical studies of p-glycoprotein inhibitors.** *Multi-Drug Resistance in Cancer.* 2010:341-58.
6. JAMROZIAK K, ROBAK T. **Pharmacogenomics of MDRI/ABCBI gene: the influence on risk and clinical outcome of haematological malignancies.** *Hematology.* 2004;9(2):91-105.
7. NIKAIDO H, PAGÈS J-M. **Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria.** *FEMS Microbiology Reviews.* 2012;36(2):340-63.
8. KALLEN A, XA, J, HIDRON A, XA, I, *et al.* **Multidrug Resistance among Gram-Negative Pathogens That Caused Healthcare-Associated Infections Reported to the National Healthcare Safety Network, 2006-2013;2008.** *Infection Control and Hospital Epidemiology.* 2010;31(5):528-31.
9. MOITRA K, LOU H, DEAN M. **Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development.** *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2011;89(4):491.
10. LEE AJ, ENDEFELDER D, ROWAN AJ, WALTHER A, BIRKBAK NJ, FUTREAL PA, *et al.* **Chromosomal instability confers intrinsic multidrug resistance.** *Cancer research.* 2011;71(5):1858-70.
11. GOUAZE-ANDERSSON V, CABOT MC. **Glycosphingolipids and drug resistance.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.* 2006;1758(12):2096-103.

12. GOUAZÉ-ANDERSSON V, JING YY, KREITENBERG AJ, BIELAWSKA A, GIULIANO AE, CABOT MC. **Ceramide and glucosylceramide upregulate expression of the multidrug resistance gene MDRI in cancer cells.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2007;1771(12):1407-17.
13. LI R, WU RA, ZHAO L, WU M, YANG L, ZOU H. **P-glycoprotein antibody functionalized carbon nanotube overcomes the multidrug resistance of human leukemia cells.** *ACS nano.* 2010;4(3):1399-408.
14. KEPLER D. **Multidrug Resistance Proteins (MRPs, ABCs): Importance for Pathophysiology and Drug Therapy.** In: Fromm MF, Kim RB, editors. *Drug Transporters.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 299-323.
15. AWASTHI S, SINGHAL SS, AWASTHI YC, MARTIN B, WOO J-H, CUNNINGHAM CC, et al. **RLIP76 and Cancer.** *Clinical Cancer Research.* 2008;14(14):4372-7.
16. KUO MT, CHEN HH, SONG I-S, SAVARAJ N, ISHIKAWA T. **The roles of copper transporters in cisplatin resistance.** *Cancer and Metastasis Reviews.* 2007;26(1):71-83.
17. DRAKE KJ, SINGHAL J, YADAV S, NADKAR A, PUNGALIYA C, SINGHAL SS, et al. **RALBPI/RLIP76 mediates multidrug resistance.** *International journal of oncology.* 2007;30(1):139-44.
18. SINGHAL SS, SINGHAL J, NAIR MP, LACKO A, AWASTHI YC, AWASTHI S. **Doxorubicin transport by RALBPI and ABCG2 in lung and breast cancer.** *International journal of oncology.* 2007;30(3):717-25.
19. HALL MD, OKABE M, SHEN D-W, LIANG X-J, GOTTESMAN MM. **The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:495-535.
20. YERUSHALMI H, SCHULDINER S. **A common binding site for substrates and protons in EmrE, an ion-coupled multidrug transporter.** *FEBS letters.* 2000;476(1-2):93-7.
21. SILVA R, VILAS-BOAS V, CARMO H, DINIS-OLIVEIRA RJ, CARVALHO F, DE LOURDES BASTOS M, et al. **Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy.** *Pharmacology & therapeutics.* 2015;149:1-123.
22. FERREIRA RJ, DOS SANTOS DJ, FERREIRA M-JU. **P-glycoprotein and membrane roles in multidrug resistance.** *Future medicinal chemistry.* 2015;7(7):929-46.
23. FLETCHER JI, WILLIAMS RT, HENDERSON MJ, NORRIS MD, HABER M. **ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology.** *Drug Resistance Updates.* 2016;26:1-9.

24. HIGGINS CF. **ABC transporters: from microorganisms to man.** Annual review of cell biology. 1992;8(1):67-113.
25. DÖRING B, PETZINGER E. **Phase 0 and phase III transport in various organs: Combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism.** Drug metabolism reviews. 2014;46(3):261-82.
26. FROMM MF. **Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers.** Trends in pharmacological sciences. 2004;25(8):423-9.
27. ABELE R, TAMPE R. **The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing.** Physiology. 2004;19(4):216-24.
28. TAKAHASHI K, KIMURA Y, NAGATA K, YAMAMOTO A, MATSUO M, UEDA K. **ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis.** Medical molecular morphology. 2005;38(1):2-12.
29. BORST P, ELFERINK RO. **Mammalian ABC transporters in health and disease.** Annual review of biochemistry. 2002;71(1):537-92.
30. GUIMARÃES CPP. **Os transportadores ABC peroxissomais: estrutura e função da ALDP.** 2004.
31. DEAN M, HAMON Y, CHIMINI G. **The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.** Journal of lipid research. 2001;42(7):1007-17.
32. TIRONA RG. **Molecular mechanisms of drug transporter regulation.** Drug Transporters: Springer; 2011. p. 373-402.
33. SHAROM FJ. **Complex interplay between the P-glycoprotein multidrug efflux pump and the membrane: its role in modulating protein function.** Frontiers in oncology. 2014;4.
34. ZHANG D-W, COLE SP, DEELEY RG. **Determinants of the Substrate Specificity of Multidrug Resistance Protein 1 ROLE OF AMINO ACID RESIDUES WITH HYDROGEN BONDING POTENTIAL IN PREDICTED TRANSMEMBRANE HELIX 17.** Journal of Biological Chemistry. 2002;277(23):20934-41.
35. KRISHNAMURTHY P, SCHUETZ J. **Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2006;46:381-410.
36. JULIANO RL, LING V. **A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1976;455(1):152-62.
37. UEDA K, CARDARELLI C, GOTTESMAN MM, PASTAN I. **Expression of a full-length cDNA for the human "MDRI" gene confers resistance to colchicine,**

- doxorubicin, and vinblastine.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 1987;84(9):3004-8.
38. CASCO S, SOTO-VEGA E. **Novel strategies against multidrug resistance mediated by P-glycoprotein.** Drugs of the Future. 2016;41(3):169-75.
39. LOO TW, CLARKE DM. **Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein.** Biochemistry and cell biology. 1999;77(1):11-23.
40. HENNESSY M, SPIERS J. **A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter.** Pharmacological research. 2007;55(1):1-15.
41. SHAROM FJ. **Multidrug resistance protein: P-glycoprotein. Drug transporters: Molecular characterization and role in drug disposition.** 2007:223-62.
42. HIGGINS CF, CALLAGHAN R, LINTON KJ, ROSENBERG MF, FORD RC, EDITORS. **Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein.** Seminars in cancer biology; 1997: Elsevier.
43. ZHOU S-F. **Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition.** Xenobiotica. 2008;38(7-8):802-32.
44. ZOLNERCIKS JK, ANDRESS EJ, NICOLAOU M, LINTON KJ. **Structure of ABC transporters.** Essays in biochemistry. 2011;50:43-61.
45. ALLER SG, YU J, WARD A, WENG Y, CHITTABOINA S, ZHUO R, et al. **Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding.** Science. 2009;323(5922):1718-22.
46. CHUFAN EE, SIM H-M, AMBUDKAR SV. **Chapter Three-Molecular Basis of the Polyspecificity of P-Glycoprotein (ABCB1): Recent Biochemical and Structural Studies.** Advances in cancer research. 2015;125:71-96.
47. LOPEZ D, MARTINEZ-LUIS S. **Marine natural products with P-glycoprotein inhibitor properties.** Marine drugs. 2014;12(1):525-46.
48. PFEIFER ND, HARDWICK RN, BROUWER KL. **Role of hepatic efflux transporters in regulating systemic and hepatocyte exposure to xenobiotics.** Annual review of pharmacology and toxicology. 2014;54:509-35.
49. SHAROM FJ. **The P-glycoprotein multidrug transporter.** Essays in biochemistry. 2011;50:161-78.
50. GIL S, SAURA R, FORESTIER F, FARINOTTI R. **P-glycoprotein expression of the human placenta during pregnancy.** Placenta. 2005;26(2):268-70.
51. KALABIS GM, KOSTAKI A, ANDREWS MH, PETROPOULOS S, GIBB W, MATTHEWS SG. **Multidrug resistance phosphoglycoprotein (ABCB1) in the mouse placenta: fetal protection.** Biology of reproduction. 2005;73(4):591-7.

52. SIARHEYEVA A, LOPEZ JJ, GLAUBITZ C. **Localization of multidrug transporter substrates within model membranes.** *Biochemistry.* 2006;45(19):6203-11.
53. HIGGINS CF, GOTTESMAN MM. **Is the multidrug transporter a flippase?** *Trends in biochemical sciences.* 1992;17(1):18-21.
54. ECKFORD PD, SHAROM FJ. **ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs.** *Chemical reviews.* 2009;109(7):2989-3011.
55. LUGO MR, SHAROM FJ. **Interaction of LDS-751 with P-glycoprotein and mapping of the location of the R drug binding site.** *Biochemistry.* 2005;44(2):643-55.
56. COMERFORD KM, WALLACE TJ, KARHAUSEN J, LOUIS NA, MONTALTO MC, COLGAN SP. **Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDRI) gene.** *Cancer research.* 2002;62(12):3387-94.
57. CALLAGHAN R, CROWLEY E, POTTER S, KERR ID. **P-glycoprotein: So Many Ways to Turn It On.** *The Journal of Clinical Pharmacology.* 2008;48(3):365-78.
58. ALVES AC, RIBEIRO D, NUNES C, REIS S. **Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies.** *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(9):2231-44.
59. PEETLA C, VIJAYARAGHAVALU S, LABHASETWAR V. **Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles.** *Advanced drug delivery reviews.* 2013;65(13):1686-98.
60. CLAY AT, SHAROM FJ. **Lipid bilayer properties control membrane partitioning, binding, and transport of p-glycoprotein substrates.** *Biochemistry.* 2013;52(2):343-54.
61. KIMURA Y, KIOKA N, KATO H, MATSUO M, UEDA K. **Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDRI/P-glycoprotein by cholesterol.** *Biochemical Journal.* 2007;401(2):597-605.
62. ECKFORD PD, SHAROM FJ. **Interaction of the P-glycoprotein multidrug efflux pump with cholesterol: effects on ATPase activity, drug binding and transport.** *Biochemistry.* 2008;47(51):13686-98.
63. SEELIG A, LANDWOJTOWICZ E. **Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers.** *European journal of pharmaceutical sciences.* 2000;12(1):31-40.
64. ÖSTERBERG T, NORINDER U. **Theoretical calculation and prediction of P-glycoprotein-interacting drugs using MolSurf parametrization and PLS statistics.** *European journal of pharmaceutical sciences.* 2000;10(4):295-303.
65. NARANG VS, FRAGA C, KUMAR N, SHEN J, THROM S, STEWART CF, et al. **Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance**

transporters at the rat blood-brain barrier. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2008;295(2):C440-C50.

66. CERMANOVA J, FUKSA L, BRCAKOVA E, HROCH M, KUCERA O, KOLOUCHOVA G, et al. **Up-regulation of renal Mdr1 and Mrp2 transporters during amiodarone pretreatment in rats.** Pharmacological research. 2010;61(2):129-35.

67. SCOTTO KW, EGAN DA. **Transcriptional regulation of MDR genes.** Multiple Drug Resistance in Cancer 2: Springer; 1998. p. 257-69.

68. SCOTTO KW. **Transcriptional regulation of ABC drug transporters.** Oncogene. 2003;22(47):7496-511.

69. NAKATSUKASA H, SILVERMAN JA, GANT TW, EVARTS RP, THORGEIRSSON SS. **Expression of multidrug resistance genes in rat liver during regeneration and after carbon tetrachloride intoxication.** Hepatology. 1993;18(5):1202-7.

70. GEKELER V, FRESE G, DIDDENS H, PROBST H. **Expression of a P-glycoprotein gene is inducible in a multidrug resistant human leukemia cell line.** Biochemical and biophysical research communications. 1988;155(2):754-60.

71. LABIALLE S, GAYET L, MARTHINET E, RIGAL D, BAGGETTO LG. **Transcriptional regulators of the human multidrug resistance I gene: recent views.** Biochemical pharmacology. 2002;64(5):943-8.

72. KIM S-H, LEE S-H, KWAK N-H, KANG C-D, CHUNG B-S. **Effect of the activated Raf protein kinase on the human multidrug resistance I (MDR1) gene promoter.** Cancer letters. 1996;98(2):199-205.

73. KIM S-H, PARK J-I, CHUNG B-S, KANG C-D, HIDAKA H. **Inhibition of MDR1 gene expression by H-87, a selective inhibitor of cAMP-dependent protein kinase.** Cancer letters. 1993;74(1-2):37-41.

74. MURSHID A, CHOU S-D, PRINCE T, ZHANG Y, BHARTI A, CALDERWOOD SK. **Protein kinase A binds and activates heat shock factor 1.** PloS one. 2010;5(11):e13830.

75. SHAREEF MM, BROWN B, SHAJAHAN S, SATHISHKUMAR S, ARNOLD SM, MOHIUDDIN M, et al. **Lack of P-glycoprotein expression by low-dose fractionated radiation results from loss of nuclear factor- κ B and NF- κ B activation in oral carcinoma cells.** Molecular Cancer Research. 2008;6(1):89-98.

76. HU Z, JIN S, SCOTTO KW. **Transcriptional Activation of the MDR1 Gene by UV Irradiation ROLE OF NF- κ B AND Sp1.** Journal of Biological Chemistry. 2000;275(4):2979-85.

77. LOO TW, BARTLETT MC, DETTY MR, CLARKE DM. **The ATPase activity of the P-glycoprotein drug pump is highly activated when the N-terminal and central regions of the nucleotide-binding domains are linked closely together.** *Journal of Biological Chemistry.* 2012;287(32):26806-16.
78. HARMSSEN S, MEIJERMAN I, FEBUS C, MAAS-BAKKER R, BEIJNEN J, SCHELLENS J. **PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line.** *Cancer chemotherapy and pharmacology.* 2010;66(4):765-71.
79. DRESSER GK, SCHWARZ UI, WILKINSON GR, KIM RB. **Coordinate induction of both cytochrome P4503A and MDRI by St John's wort in healthy subjects.** *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2003;73(1):41-50.
80. HAMMAN MA, BRUCE MA, HAEHNER-DANIELS BD, HALL SD. **The effect of rifampin administration on the disposition of fexofenadine.** *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2001;69(3):114-21.
81. CHEN Y, TANG Y, WANG M-T, ZENG S, NIE D. **Human pregnane X receptor and resistance to chemotherapy in prostate cancer.** *Cancer research.* 2007;67(21):10361-7.
82. GUPTA D, VENKATESH M, WANG H, KIM S, SINZ M, GOLDBERG GL, et al. **Expanding the roles for pregnane X receptor in cancer: proliferation and drug resistance in ovarian cancer.** *Clinical Cancer Research.* 2008;14(17):5332-40.
83. AMIN ML. **P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery.** *Drug target insights.* 2013;7:27.
84. FU D. **Where is it and how does it get there—intracellular localization and traffic of P-glycoprotein.** *Frontiers in oncology.* 2013;3.
85. ABDALLAH HM, AL-ABD AM, EL-DINE RS, EL-HALAWANY AM. **P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review.** *Journal of advanced research.* 2015;6(1):45-62.
86. THOMAS H, COLEY HM. **Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein.** *Cancer control.* 2003;10(2):159-.
87. SANE R, AGARWAL S, ELMQUIST WF. **Brain distribution and bioavailability of elacridar after different routes of administration in the mouse.** *Drug Metabolism and Disposition.* 2012;40(8):1612-9.

88. WEIDNER LD, FUNG KL, KANNAN P, MOEN JK, KUMAR JS, MULDER J, et al. **Tariquidar is an Inhibitor and Not a Substrate of Human and Mouse P-glycoprotein.** Drug Metabolism and Disposition. 2016;44(2):275-82.
89. PATEL NR, RATHI A, MONGAYT D, TORCHILIN VP. **Reversal of multidrug resistance by co-delivery of tariquidar (XR9576) and paclitaxel using long-circulating liposomes.** International journal of pharmaceutics. 2011;416(1):296-9.
90. CRIPE LD, UNO H, PAIETTA EM, LITZOW MR, KETTERLING RP, BENNETT JM, et al. **Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999.** Blood. 2010;116(20):4077-85.
91. GERRARD G, PAYNE E, BAKER RJ, JONES DT, POTTER M, PRENTICE HG, et al. **Clinical effects and P-glycoprotein inhibition in patients with acute myeloid leukemia treated with zosuquidar trihydrochloride, daunorubicin and cytarabine.** Haematologica. 2004;89(7):782-90.
92. LIU X, DING X, DESHMUKH G, LIEDERER BM, HOP CE. **Use of the cassette-dosing approach to assess brain penetration in drug discovery.** Drug Metabolism and Disposition. 2012;40(5):963-9.
93. SUN H, LIU X-D, LIU Q, WANG F-P, BAO X-Q, ZHANG D. **Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by the novel tetrandrine derivative W6.** Journal of Asian natural products research. 2015;17(6):638-48.
94. BARTHOMEUF C, GRASSI JM, DEMEULE M, FOURNIER C, BOIVIN D, BELIVEAU R. **Inhibition of P-glycoprotein transport function and reversion of MDRI multidrug resistance by cniadiadin.** Cancer chemotherapy and pharmacology. 2005;56(2):173-81.
95. MUÑOZ-MARTÍNEZ F, REYES CP, PÉREZ-LOMAS AL, JIMÉNEZ IA, GAMARRO F, CASTANYS S. **Insights into the molecular mechanism of action of Celastraceae sesquiterpenes as specific, non-transported inhibitors of human P-glycoprotein.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2006;1758(1):98-110.
96. KARS MD, GÜNDÜZ U, ÜNEY K, BAŞ AL. **Exploring a natural MDR reversal agent: potential of medicinal food supplement Nerium oleander leaf distillate.** Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 2013;3(8):644-9.
97. CASTAGNOLO D, CONTEMORI L, MACCARI G, AVRAMOVA SI, NERI A, SGARAGLI G, et al. **From taxuspine X to structurally simplified taxanes with**

remarkable **P-Glycoprotein inhibitory activity**. ACS medicinal chemistry letters. 2010;1(8):416-21.

98. CALLAGHAN R, STAFFORD A, EPAND RM. **Increased accumulation of drugs in a multidrug resistant cell line by alteration of membrane biophysical properties**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 1993;1175(3):277-82.