

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSA

IVAN NEVES JUNIOR

**Avaliação da Expressão do Gene MDR1 (Glicoproteína-P)
e Atividade de Efluxo em Células do Sangue Periférico de
Pacientes sob Tratamento da Tuberculose Multirresistente**

RIO DE JANEIRO

2013

IVAN NEVES JUNIOR

**Avaliação da Expressão do Gene MDR1 (Glicoproteína-P)
e Atividade de Efluxo em Células do Sangue Periférico de
Pacientes sob Tratamento da Tuberculose Multirresistente**

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, sob orientadora Prof^a Dr^a Liane de Castro.

RIO DE JANEIRO

2013

IVAN NEVES JUNIOR

**Avaliação da Expressão do Gene MDR1 (Glicoproteína-P)
e Atividade de Efluxo em Células do Sangue Periférico de
Pacientes sob Tratamento da Tuberculose Multirresistente**

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisa Clínica
Evandro Chagas como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Ciências do
Programa de Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Liane de Castro.

Aprovado em: 12/11/2013

BANCA EXAMINADORA

Dr^ª. Marli Jane Martins Costa – IPEC (Presidente)

Dr^ª. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp - IOC

Dr. Rodrigo de Almeida Paes - IPEC

Dr^ª Márcia dos Santos Lázera - IPEC

Dr^ª. Simone da Costa Cruz Silva – IPEC

Dr^ª. Camila Zaverucha do Valle – IPEC (Suplente)

RIO DE JANEIRO

2013

Para minha família querida!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora por todo apoio, conhecimento e seus pontos de vista e por me apresentar a importância dos estudos em Farmacogenética.

À colaboradora neste estudo e esposa Simone Carvalho Neves pelo apoio constante e dedicação na realização deste projeto.

À Dra. Marli Jane pelo apoio, visão clínica e dedicação para que o estudo acontecesse, por contribuir para o desenvolvimento da pesquisa clínica com visão interdisciplinar.

À Dr. Simone Silva pela revisão da tese e os incentivos.

À Dra. Valéria Rolla pelo total apoio ao projeto e sua valorosa contribuição.

À chefe da coleta Solange Alves Cruz e sua equipe pelo apoio, sem o qual este estudo não seria possível.

Aos profissionais do ensino, Priscilla, Carla, Tati e Marcelo pelo apoio constante quando eu desanimava.

À Profa. Dra. Marizete pelo apoio constante para que eu não desistisse nos piores momentos no decorrer deste estudo.

À Dra. Cristina Poças pelas palavras de apoio, cobranças positivas.

Aos professores de todas as disciplinas que cursei durante o período de tese.

Ao Dr. Alejandro que sempre mostrou preocupação com a continuidade do meu doutoramento e palavras de apoio.

À Dra. Valdiléa por me autorizar cursar o doutorado e todo apoio imprescindível.

Ao colega Douglas Baeta que por várias vezes me substituiu na Chefia do Sial para eu fazer as disciplinas.

À todos os meus colegas que direta ou indiretamente me deram força e contribuíram para a conclusão desta etapa.

Graças a Deus!

Neves, Jr I. **Avaliação da expressão do gene MDR1 (glicoproteína-P) e atividade de efluxo em células do sangue periférico de pacientes sob tratamento da tuberculose multirresistente**, Rio de Janeiro, 2013. 81 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

O regime de tratamento com múltiplas drogas é correspondente a uma interação de drogas que pode causar efeitos adversos e falha no tratamento. Essa interação pode gerar modificações funcionais dos transportadores de membrana e por consequência a biodisponibilidade das drogas durante o tratamento. Dentre os transportadores de drogas transmembranares está a glicoproteína-P (P-gp), uma proteína de 170KD, produto do gene *MDR1*, caracterizada como uma “ATP Binding cassette” (ABC). Seu papel está muito bem definido nas células neoplásicas multirresistentes a drogas, assim como sua relação com as drogas para o tratamento da infecção pelo HIV. Entretanto, pouco tem sido estudado sobre esta bomba de efluxo na tuberculose multirresistente (TBMR). Neste estudo analisamos por citometria de fluxo sua expressão e atividade de efluxo nos monócitos, principal célula relacionada com a tuberculose e também em linfócitos e granulócitos do sangue periférico por meio da citometria de fluxo. A taxa de efluxo foi medida através do uso da Rodamina 123 (Rho123) e a expressão da P-gp através do anticorpo monoclonal anti-CD243 (clone UIC2). A utilização direta do sangue total para a determinação da atividade de efluxo por citometria de fluxo caracterizou a implantação de uma nova ferramenta de análise para a pesquisa. A análise contemplou 52% do total de pacientes em tratamento de TBMR no ambulatório do Laboratório de Pesquisa em Micobacterioses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC). Para as análises foram levadas em consideração a idade, cor da pele, o tempo de tratamento e a quantidade de drogas administradas. O estudo revelou que há correlação entre a expressão da P-gp nos monócitos e a idade dos pacientes ($P < 0,01$). Diferenças entre pacientes brancos e não brancos também foram observadas. Em linfócitos a expressão de P-gp quando aumentada foi diretamente proporcional à atividade de efluxo observada nos monócitos ($P < 0,05$). Além disso, pacientes submetidos ao tratamento para TBMR por até seis meses apresentaram uma maior expressão de P-gp e, linfócitos quando comparados àqueles que receberam o tratamento por mais de seis meses ($P < 0,01$).

Descritores: 1. *MDR1* 2. Glicoproteína-P 3. Tuberculose Multirresistente 4. Citometria de Fluxo.

Neves, Jr I. **Evaluation of *MDR1* gene expression (P-glycoprotein) and activity of peripheral blood cells of tuberculosis patients undergoing multidrug resistant treatment**, Rio de Janeiro, 2013. 81 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas] - Evandro Chagas Clinical Research Institute.

ABSTRACT

When two or more drugs are administered, such interactions can cause additive, synergistic or antagonistic effects. The drug transporters may undergo treatments effects and therefore change the drugs bioavailability during the treatment and can cause treatment failure. Among the known drug transporters there is transmembrane P-glycoprotein (P-gp). It is a 170 KDa transmembrane protein which is a product of multidrug resistance *MDR1* gene. This protein is a well-characterized ABC transporter (ATP Binding Cassette) and is responsible for efflux of the chemotherapeutic agents from resistant cancer cells. There are few studies about this protein in multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). In this study, P-gp expression and activity were detected by flow cytometry in monocytes, the main cell related with the *M.tuberculosis* infection, as well as in lymphocytes and granulocytes from whole peripheral blood. P-gp mediated efflux was determined indirectly by measuring the retention of a fluorescent P-gp substrate, rhodamine 123 (Rho123). P-gp expression was assessed using anti-P-gp monoclonal antibody UIC2 (CD243). The efflux activity with whole blood using flow cytometry technique as a new tool to pharmacogenetic research was developed in this study. We analyzed 52 % of outpatient in MDR-TB treatment from Laboratory Research Mycobacteriosis Institute Evandro Chagas Clinical Research (IPEC). We considered variables as age, race, treatment time, amount of drug administered at the time of blood collection and their correlation with P-gp expression and activity. The result revealed a correlation between the P-gp expression in monocytes and age ($P < 0.01$). In addition, difference between white and nonwhite patients was observed. Lymphocyte P-gp expression was statistically significant greater in patients with increased monocytes efflux activity evidenced by P-gp inhibition with CSA ($P < 0.05$). Patients undergoing MDR-TB treatment for six months had a higher P-gp expression in lymphocytes compared to those who received the treatment for more than six months ($P < 0.01$).

Keywords: 1. *MDR1* 2. P-Glycoprotein expression 3. Multiresistant Tuberculosis 4. Flow Cytometry

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.1-CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
1.2- OBJETIVOS	2
1.2.1 - Geral	2
1.2.2 - Específicos	2
1.3 - Justificativa	2
2 - REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 - A Tuberculose no Brasil	4
2.1.1- A Resistência ao Tratamento da Tuberculose	5
2.1.2 - Biotransformação dos Fármacos	6
2.1.3- Reações de Oxidação/Redução	8
2.1.4 - Reações de Conjugação/Hidrólise	9
2.1.5- Transporte dos Fármacos	9
2.1.6 - A Glicoproteína - P (P-gp)	10
2.1.7- A P-Gp e as Interações de Drogas	15
2.2 - FARMACOGENÉTICA E A EXPRESSÃO PROTÉICA	20
2.2.1- A expressão de proteínas	20
2.2.2- Uso da Citometria na Farmacogenética	21
2.2.3- A Citometria de Fluxo	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 - Desenho do estudo	24
3.1.2 - Critério de Inclusão	24
3.1.3 - Critério de Exclusão	25
3.1.4 - Característica dos pacientes que participaram do estudo	25
3.1.5 - Coleta da Amostra de Sangue	26
3.1.6 - Determinação da Expressão da P-Gp por Citometria de Fluxo	26
3.1.7 - Determinação da Atividade de Efluxo por Citometria de Fluxo	27
3.1.8 - Análise Técnica da determinação por Citometria de Fluxo	29
3.1.9 - Coleção de Dados dos Sujeitos de Pesquisa	30
3.1.10 - Análise Estatística	31
4 RESULTADOS	

4.1 - Diferenças na incorporação da Rho123 entre linfócitos, monócitos e granulócitos	32
4.1.2 - Determinação de efluxo usando Rho 123 com sangue total	33
4.1.3 - Correlação da atividade de efluxo entre linfócitos, monócitos e granulócitos	34
4.1.4 - Análise da expressão de P-gp entre as populações celulares	35
4.1.5 - Correlação da idade do paciente com a expressão e atividade da P-gp	36
4.1.6 - Análise da cor da pele e sexo dos pacientes com expressão e atividade de efluxo da P-gp	37
4.1.7 - Relação do tempo de tratamento dos pacientes com expressão e atividade da P-gp	39
4.1.8 - Indução da expressão de P-gp nos monócitos pela Rifampicina	40
4.1.10 - Correlação da expressão da P-gp em linfócitos dos pacientes com a atividade de efluxo dos monócitos	41
5. DISCUSSÃO	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO	55

ABREVIATURAS

ABC - ATP Binding cassette

ADN - Ácido desoxirribonucleico

CI – Coeficiente de Incidência

CSA – Ciclosporina-A

CYP3A4 – Citocromo P450 3A4

DNR - Dauromicina

DP – Desvio Padrão

ECD – Texas red

EP – Erro Padrão

FITC - Fluoresceína

HIV – Vírus da imunodeficiência Humana

IQR – Intervalo interquartil

MDR-TB - Multidrug-resistant tuberculosis

NADPH -

MDR-1 - Multidrug resistance protein 1

OATP - (do inglês, *organic anion transporting (polypeptide)*) – Polipeptídeo transportador de ânions orgânicos

OCT - (do inglês, *organic cation transporter*) - transportador de cátions orgânicos

OAT - (do inglês, *organic anion transporter*) - transportador de ânions orgânicos

OMS – Organização Mundial de Saúde

P-gp – Glicoproteína-P

PE - Ficoeritrina

PerCP -Proteína Peridinina Clorofila

PEDY647 – R- Ficoeritrina Dyomics 647

PC5 – Ficoeritrina - 5

PCR – Reação da polimerase em Cadeia

PI – Iodeto de Propídeo

7-AAD - 7- aminoactinomicina-7

PXR - Pregnane X receptor

Rho-123 – Rodamina – 123

RIF - Rifampicina

RI – Rifampicina e Isoniazida

RIPE - Rifampicina/Isoniazida/Pirazinamida/Etambutol.

SNPs - (do inglês, *single nucleotide polymorphism*) - Polimorfismo de nucleotídeo único

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TB - Tuberculose

TBMR – Tuberculose Multirresistente

TSA – Teste de Suscetibilidade a Antibióticos

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

X - Média

XDRTB - (do inglês, *Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*) - Tuberculose Amplamente Resistente

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Regime de tratamento para TBMR	7
Fig. 1 - Imagem representativa da atividade de efluxo da P-gp	11
Fig. 2 - Distribuição da P-gp no organismo humano	13
Fig. 3 - MDR1 mRNA em indivíduos saudáveis	14
Fig. 4 - Curva farmacocinética do Lopinavir	16
Quadro 2 – Lista dos inibidores da P-gp	17
Quadro 3 – Inibidores da P-gp	19
Fluxograma. 1 – Fluxograma da determinação da atividade de efluxo	28
Fig. 5 - Gráficos da incorporação da Rho 123 pelas células do sangue total	32
Fig. 6 - Gráficos da determinação da atividade de efluxo	33
Fig. 7 - Correlação da atividade de efluxo entre as populações celulares	34
Tabela 2 - Expressão da P-gp nas populações celulares	35
Fig. 8 - Gráficos representativo da análise da expressão da P-gp	35
Fig. 9 - Correlação entre idade e expressão e atividade da P-gp em monócitos	36
Fig. 10 - Gráfico da análise da expressão P-gp com a cor da pele dos pacientes	37
Fig. 11 - Gráfico da análise da atividade P-gp com a cor da pele dos pacientes	38
Fig. 12 - Gráficos da análise da P-gp e o tempo de tratamento	39
Fig. 13 – Gráfico da indução da P-gp pela Rifampicina	40
Fig. 14 – Gráfico da associação da expressão da P-gp em linfócito e atividade de efluxo nos monócitos	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As variações na resposta ao tratamento podem sofrer influências do metabolismo do indivíduo. Em geral, os medicamentos são convertidos em metabólitos mais solúveis em água, facilitando sua excreção. Esse processo envolve reações de fase I (oxidação, redução e hidrólise), reações de fase II (conjugação, acetilação, glicuronidação, sulfatação e metilação) e de fase III (excreção por transportadores de membranas) (Wilkinson, 2005).

A significância clínica da P-gp e da enzima CYP3A4 (Citocromo P450 3A4) está na combinação das enzimas metabolizadoras e as proteínas transportadoras que têm um papel determinante na taxa de absorção de xenobióticos do lúmen intestinal para o sistema circulatório (König et al., 2013). Muitos compostos que são substratos da P-gp também são substratos de CYP3A4. De maneira semelhante ao que ocorre nos enterócitos, ocorre também no fígado e nos rins onde ambos, P-gp e CYP3A4, são expressos. Então, devido à co-expressão e sobreposição de especificidade é aceitável que ambos atuem sinergicamente, limitando a absorção de drogas e também seu metabolismo e conseqüentemente a biodisponibilidade (Zoppi et al., 2000). Portanto, o significativo impacto na interação dessas duas proteínas sobre as interações droga-droga é indiscutível. Entretanto, a magnitude dessas interações e seus efeitos nos indivíduos dependem da sua conformação bioquímica, ou seja, a droga é um substrato indutor ou inibidor do CYP3A4 e/ou P-gp (König et al., 2013).

Evidências de que as enzimas metabolizadoras e as proteínas transportadoras podem afetar profundamente o metabolismo das drogas, ocorre, por exemplo, quando duas ou mais drogas são administradas para o tratamento do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), podendo gerar efeitos sinérgicos ou antagonistas (König et al., 2013). As interações medicamentosas podem resultar em inesperado risco de vida e até mesmo toxicidades letais. Até 10% de todas as admissões em hospitais gerais são causadas pelo uso de combinações de fármacos, resultado de potenciais e graves interações medicamentosas (Fattinger et al., 2000). As reações adversas medicamentosas podem ser especialmente graves quando estas interações envolvem agentes citotóxicos anticancerígenos. A interferência dos “ATP binding cassette” (ABC) e outros transportadores estão cada vez mais sendo identificadas como um mecanismo clinicamente importante nas interações medicamentosas (Beijnen & Schellens, 2004; Marchetti et al., 2007).

O tratamento dos pacientes com tuberculose multirresistente (TBMR) realizado em regime de múltiplas drogas está sujeito a sinergismos e antagonismos entre as mesmas, podendo aumentar ou diminuir a biodisponibilidade de uma ou outra droga correlacionada com a expressão e atividade da P-gp. Entretanto, não há estudos desta natureza na literatura envolvendo pacientes TBMR. Esta ausência de dados na literatura foi um fator importante para estimular a realização deste estudo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral:

Descrever a atividade de efluxo e a expressão da P-gp em pacientes TBMR acompanhados no ambulatório do Laboratório de Micobacterioses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC).

1.2.1 Específicos:

- Implantar a técnica de quantificação da expressão da P-gp em células do sangue total periférico por citometria de fluxo;
- Implantar a técnica de determinação da atividade de efluxo utilizando sangue total periférico por citometria de fluxo;
- Determinar a frequência da expressão da P-gp nos monócitos, linfócitos e granulócitos do sangue periférico de pacientes TBMR;
- Correlacionar a atividade de efluxo pela P-gp e sua expressão em monócitos com diferentes parâmetros biológicos de relevância clínica.

1.3 JUSTIFICATIVA

O tema desta tese foi escolhido por se tratar de uma contribuição de fundamental importância para um maior conhecimento da tuberculose TBMR e também pelo fato da

glicoproteína de membrana (P-gp) estar envolvida na absorção, distribuição, metabolização e excreção de diversos fármacos no organismo (Ambudkar et al., 2003).

O surgimento da TBMR tem sido uma preocupação constante dos profissionais da saúde principalmente frente à alta prevalência de TBMR primária entre pacientes sem histórico de tratamentos anteriores. Tratar a TBMR é complexo, lento e envolve o uso de medicamentos que podem causar eventos adversos graves e muitas vezes esses tratamentos não são eficazes. As cepas bacterianas resistentes são um fator de contribuição para o aumento no número de mortes por tuberculose, além de dificultar o tratamento e a prevenção da doença. Tais dados sinalizam para a necessidade urgente do conhecimento dos mecanismos que levam ao desenvolvimento da TBMR.

A pesquisa sobre a expressão e atividade de efluxo em pacientes TBMR é de fundamental importância porque a exemplo dos pacientes infectados pelo HIV, estes pacientes são tratados com uma associação de drogas e já se sabe que as concentrações plasmáticas são influenciadas por drogas do tratamento que inibem a P-gp. No entanto, se há grande quantidade de publicações do impacto da coadministração de drogas na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), há muito pouco ou quase nada no que diz respeito ao estudo da tuberculose. Então, este estudo é o início da caracterização do impacto de um transportador transmembranar na tuberculose multirresistente que tem o uso de associação de drogas como rotina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A TUBERCULOSE NO BRASIL

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e pode acometer vários órgãos e/ou sistemas do corpo humano. A apresentação da TB na forma clínica pulmonar é a mais frequente e também a mais relevante para a saúde pública, pois é essa que quando bacífera, a responsável pela manutenção da cadeia de transmissão da doença (Ministério da Saúde, 2011).

A TB pode se apresentar como formas clínicas: pulmonar e extrapulmonar. Na forma clínica pulmonar pode-se apresentar sob a forma primária (mais comum em crianças), pós-primária (ou secundária) (mais comum em adolescentes e adulto jovem) ou miliar (mais comum em crianças e adultos jovens). Os sintomas clássicos da TB pulmonar são: tosse persistente, produtiva ou não (com muco ou eventualmente sangue), febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento (Ministério da Saúde, 2011).

As apresentações extrapulmonares da TB têm seus sinais e sintomas dependentes dos órgãos e/ou sistemas acometidos. Sua ocorrência aumenta entre pacientes com AIDS avançada. As principais formas clínicas da TB extrapulmonar são: TB pleural, TB ganglionar periférica, TB meningoencefálica, TB pericárdica e TB óssea (Ministério da Saúde, 2011).

A TB continua sendo um importante problema de saúde no Brasil e no mundo. O Brasil é um dos 22 países priorizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que concentra 80% da carga mundial de tuberculose. No País, foram notificados 70.047 casos novos em 2012, no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o que equivale ao coeficiente de incidência (CI) de 36,1/100.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2013). Quando comparado aos outros países, o Brasil ocupa a 17ª posição em relação ao número de casos no mundo (Ministério da Saúde, 2011). Mesmo havendo tendência de queda dos dois indicadores, o Brasil ainda não conseguiu alcançar a meta, estipulada pela OMS – curar 85% dos casos novos bacilíferos. Em 2010, a proporção de cura foi de 73,4% e em 2011 alcançou-se 71,6% (Ministério da Saúde, 2013).

Para o enfrentamento da tuberculose, o Ministério da Saúde pretende implantar um método de diagnóstico que já avalia a resistência à Rifampicina através do PCR em tempo real, permitindo identificar o *Mycobacterium tuberculosis* em duas horas, mas hoje ainda são a baciloscopia e a cultura os métodos preconizados para o diagnóstico. A pesquisa do bacilo

álcool-ácido-resistente (baciloscopia) é, atualmente, a técnica mais utilizada no Brasil, não apenas para o diagnóstico, como também para o controle do tratamento. Desde que executada corretamente em todas as suas fases, ela permite detectar de 60 a 80% dos casos, com resultado em até 24 horas. Em 2012, dos 59.972 casos de TB pulmonar registrados no País, 85,8% realizaram baciloscopia no momento do diagnóstico da TB, desses 37.907 (73,7%) tiveram o resultado positivo (Ministério da Saúde, 2013).

A cultura, metodologia considerada “padrão ouro” para o diagnóstico da tuberculose, quando associada à identificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos, permite o diagnóstico dos casos de TB resistente a drogas. No entanto, esse método pode levar dois meses para fornecer o resultado (Ministério da Saúde, 2013; WHO, 2010).

2.1.1 A Resistência ao Tratamento da Tuberculose

No Brasil, o esquema de tratamento para TB mais utilizado consiste no uso de Rifampicina (R), Isoniazida (I), Pirazinamida (P) e Etambutol por dois meses, seguidos por RI por quatro meses (Esquema básico), totalizando seis meses de tratamento. A inclusão do Etambutol no tratamento da TB foi iniciada no final do ano de 2009, sendo indicado para todos os casos de TB pulmonar ou extrapulmonar (exceto meningite). Em pacientes com evolução clínica inicial não satisfatória e TB extrapulmonar, como meningoencefalites, o tempo de tratamento poderá ser prolongado, na sua 2ª fase, por mais três meses (2RIPE/7RI) (Ministério da Saúde, 2011).

O esquema básico também é utilizado em casos de recidiva após cura (até o resultado do TSA), em pacientes em tratamento por mais de 30 dias que necessitem de nova terapia ou em casos de retorno após abandono (Ministério da Saúde, 2011).

A resistência aos fármacos anti-TB pode ser classificada em: resistência natural que surge naturalmente no processo de multiplicação do bacilo; resistência primária onde é observada em pacientes nunca tratados para TB, mas contaminados por bacilos previamente resistentes e a resistência adquirida ou secundária identificada em pacientes com TB inicialmente sensível, mas que se tornam resistentes após a exposição aos medicamentos. Na resistência adquirida, as principais causas são em decorrência de esquemas inadequados, uso irregular do esquema terapêutico por má adesão ou falta temporária de medicamentos. Porém, a resistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos esquemas terapêuticos propostos vem se tornando cada vez mais frequente, representando a maior ameaça à efetividade do controle da TB. Isso torna o tratamento mais longo e conseqüentemente mais dispendioso, trazendo

efeitos secundários mais intensos ao paciente. A TBMR é uma forma específica de TB na qual o bacilo apresenta resistência simultânea a no mínimo, dois medicamentos, a Isoniazida e a Rifampicina. O tratamento da TBMR deve ser realizado por 18 a 24 meses e consiste na utilização das seguintes drogas: Estreptomicina, Etambutol, Levofloxacina, Pirazinamida e Terizidona na fase intensiva realizada duas etapas e Etambutol, Levofloxacina e Terizidona na fase de manutenção (Tabela 1). Em casos mais graves, o bacilo pode apresentar resistência às fluoroquinolonas e também às drogas injetáveis de segunda linha (estreptomicina, canamicina, e amicacina), configurando a denominada tuberculose extensivamente resistente ou XDRTB (do inglês, *Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*) (Ministério da Saúde, 2011).

A incidência dos casos multirresistentes tem aumentado desde a introdução dos primeiros tratamentos para TB em 1944. A emergência das formas multirresistentes seguiu-se ao uso amplo da rifampicina a partir da década de 70. O número de casos confirmados de TBMR no mundo notificados à OMS foi de 9,27 milhões, sendo distribuído na Ásia (55%) na África (31%), nas regiões do Mediterrâneo Oriental (6%), Europa (5%) e nas Américas (3%) (Ministério da Saúde, 2011).

Análises epidemiológicas sobre a resistência a drogas anti-TB no período de 2002 a 2007 demonstraram uma taxa mediana de resistência (11.1%), sendo que havia muitas flutuações, dependendo da região. A prevalência de TBMR em casos de TB sem tratamento prévio foi de 0-7% na China, 11,1% ao norte das Ilhas Marianas, entre 6,8-22,3% em nove países constituintes da antiga União Soviética - 19,3% em Mondova, 22,3% no Azerbaijão (Zignol et al., 2012). No Brasil, os dados epidemiológicos sobre TBMR ainda são incipientes. Estudos recentes realizados com pacientes de Minas Gerais entre os anos de 2002 e 2005 descreveram taxas de 10% de resistência e 1% de TBMR nos pacientes (De Miranda et al., 2009).

Dados sobre a incidência de TBMR no Brasil, no período de 1994 a 2006, indicam que os padrões de resistência adquirida e primária foram, respectivamente, de 95,9% e 4,1%, sugerindo-se que o fenômeno de TBMR seja gerado, basicamente, por tratamentos anteriores mal conduzidos (Ministério da Saúde, 2011). Entretanto, sabe-se que a questão é mais ampla e complexa, uma vez que pacientes tratados com as mais diversas drogas apresentam variabilidade de resposta e de susceptibilidade à toxicidade a medicamentos (Ministério da Saúde, 2011). Dentre as causas de variação na resposta individual à mesma posologia de um fármaco podem-se destacar a idade, os fatores genéticos e imunológicos, as enfermidades e a ocorrência de interações entre princípios ativos (Rang et al., 2007). A variabilidade genética pode alterar tanto a farmacodinâmica, ou seja, a relação entre a dose administrada e os efeitos

produzidos, como a farmacocinética, que relaciona os eventos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção da substância à sua concentração sistêmica (Wang & Weinshilboum, 2006).

QUADRO 1- Regime de Tratamento para TBMR

REGIME	DROGAS	DOSES POR PESO				MESES
		Até 20kg	21kg a 35kg	36kg a 50kg	> 50kg	
2SSELZT Fase Intensiva 1ª etapa	Estreptomicina	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia - 1000mg/dia	1000mg/dia	2
	Etambutol	25mg/kg/dia	400mg/dia - 800mg/dia	800mg/dia - 1200mg	1200mg/dia	
	Levofloxacina	10mg/kg/dia	250mg/dia - 500mg/dia	500mg/dia - 750mg/dia	750mg/dia	
	Pirazinamida	35mg/kg/dia	1000mg/dia	1500mg/dia	1500mg/dia	
	Terizidona	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia	750mg/dia - 1000mg/dia	
4S3ELZT Fase Intensiva 2ª etapa	Estreptomicina	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia - 1000mg/dia	1000mg/dia	4
	Etambutol	25mg/kg/dia	400mg/dia - 800mg/dia	800mg/dia - 1200mg	1200mg/dia	
	Levofloxacina	10mg/kg/dia	250mg/dia - 500mg/dia	500mg/dia - 750mg/dia	750mg/dia	
	Pirazinamida	35mg/kg/dia	1000mg/dia	1500mg/dia	1500mg/dia	
	Terizidona	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia	750mg/dia - 1000mg/dia	
12 ELT Fase de Manutenção	Etambutol	25mg/kg/dia	400mg/dia - 800mg/dia	800mg/dia - 1200mg/dia	1200mg/dia	12
	Levofloxacina	10mg/kg/dia	250mg/dia - 500mg/dia	500mg/dia - 750mg/dia	750mg/dia	
	Terizidona	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia	750mg/dia - 1000mg/dia	

Esquema de tratamento para TBMR segundo o Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose – Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde, 2011.

2.1.2 Biotransformação dos Fármacos

Diversos Fármacos são lipofílicos, e esta característica permite ao fármaco atravessar as membranas das células dos tecidos, como ocorre na mucosa do intestino mucosa, que é responsável por metabolizar alguns fármacos com maior intensidade do que o fígado, ou no tecido-alvo. O mesmo processo químico que aumenta a biodisponibilidade dos fármacos tem

influência sobre a excreção renal, visto que a depuração pelo rim exige que esses fármacos se tornem mais hidrofílicos, de modo que possam ser solúveis na urina aquosa. Então, as reações de biotransformação geralmente têm por finalidade aumentar a hidrofílicidade dos compostos tornando-os mais susceptível de serem excretados pelos rins (Bjornsson et al., 2003; Zhang et al., 2006). As reações de biotransformação foram classificadas em dois grupos: as reações de fase I (de oxidação/redução) e fase II (de conjugação/hidrólise). Tradicionalmente, as reações de oxidação geralmente converte o fármaco ingerido em um metabólito mais polar pela introdução ou desmascaramento de grupos funcionais polares, como grupos hidroxila (-OH), tiol (-SH) ou amina (-NH₂). Com frequência, esses metabólitos são farmacologicamente inativos, embora em alguns casos a atividade seja apenas modificada ou até ampliada. Após este processo esses metabólitos podem ser secretados sem qualquer modificação adicional. Muitos produtos da fase I não são eliminados rapidamente e sofrem uma reação subsequente no qual um substrato como o ácido glicurônico, ácido sulfúrico, ácido acético ou um aminoácido (Wilkinson 2005; Zhang et al., 2006). Esta reação é uma conjugação de fase II que modificam os compostos criando conjugados mais polares do que os metabólitos da fase I. As reações de conjugação ocorrem independentemente ou em ordem inversa das reações de oxidação/redução e pode haver uma competição pelo mesmo substrato entre as enzimas envolvidas nas reações de oxidação/redução e de conjugação/hidrólise. (Yuan et al., 2002; Ho & Kim, 2005; Wilkinson, 2005; Zhang et al., 2009).

2.1.3 Reações de Oxidação/Redução

Muitas enzimas envolvidas na reação de fase I localizam-se nas membranas do retículo endoplasmático dos hepatócitos e também nas células de outros tecidos. As enzimas responsáveis por essas reações de fase I são caracterizadas como oxidases; essas enzimas são, em sua maioria, hemoproteínas monooxigenases da classe do citocromo P450. As enzimas P450 (CYP) também são classificadas como oxidases de função mista microsômicas. Essas enzimas estão envolvidas no metabolismo de cerca de 75% de todos os medicamentos utilizados atualmente (Wilkinson, 2005; Zhang et al., 2009). A reação continua assim que fármaco se conjuga ao citocromo P450 oxidado (Fe³⁺), formando um complexo que, a seguir, é reduzido através de duas etapas distintas de oxidação/redução sequenciais (Wu & Benet 2005; Andersson et al., 2005).

O fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) é o principal doador de elétrons em todas as etapas, utilizando uma flavoproteína redutase. Na primeira etapa, ocorre

a redução através do elétron doado do complexo citocromo P450–fármaco (Wilkinson, 2005; Zhang et al., 2009). Numa segunda etapa, o elétron reduz o oxigênio molecular, formando um complexo de oxigênio ativado–citocromo P450–fármaco. Na etapa final, quanto mais o complexo se torna ativo através de rearranjo, ocorre a transferência do átomo de oxigênio reativo para o fármaco, resultando na formação do produto oxidado do fármaco, com reciclagem do citocromo P450 oxidado no processo. Os nomes das enzimas do citocromo P450 são precedidas pelo P450 e depois o número da família de enzimas P450, letra maiúscula da subfamília e um número adicional para identificar a enzima específica como por exemplo a P450 3A4. (Wilkinson, 2005). Em seu conjunto, as reações mediadas pelo P450 respondem por mais de 95% das biotransformações oxidativas (Cvetkovic et al., 1999; Guengerich, 2003; Wilkinson, 2005; Ho & Kim, 2005).

2.1.4 Reações de Conjugação/Hidrólise

Na reação de fase II, os substratos dessas reações incluem tanto metabólitos de reações de oxidação quanto compostos que já contêm grupos químicos específicos para conjugação, como hidroxila (-OH), amina (-NH₂) ou carboxila (-COOH). Esses substratos são acoplados a metabólitos endógenos, como o ácido glicurônico e seus derivados, ácido sulfúrico, ácido acético, aminoácidos e o tripeptídeo glutationa, através de enzimas de transferência, em reações que geralmente envolvem intermediários de alta energia. Um segundo conjunto de mecanismos destinados a modificar os compostos para sua excreção (Wilkinson, 2005; Zhang et al., 2009). A reação química da hidrólise de longe mais estreitamente relacionada com a fase II do que com a fase I. As enzimas de conjugação e de hidrólise encontram-se tanto no citosol quanto no retículo endoplasmático dos hepatócitos assim como em outros tecidos. Na maioria dos casos, o processo as reações de fase II torna o fármaco mais polar (Ayrton & Morgan 2001; Guengerich, 2003; Wilkinson, 2005; Ho & Kim, 2005).

2.1.5 Transporte dos Fármacos

Embora muitos fármacos sejam lipofílicos o suficiente para atravessar passivamente as membranas celulares, sabe-se que muitos deles também precisam ser transportados ativamente para o interior das células. Esse fato apresenta consequências significativas para a biodisponibilidade oral (transporte nos enterócitos ou excreção ativa na luz intestinal), para o metabolismo hepático (transporte nos hepatócitos para metabolismo enzimático e excreção na

bile) e para a depuração renal (transporte nas células tubulares proximais e excreção na luz tubular). Esses processos são mediados por diversas moléculas importantes. A proteína de resistência a múltiplas drogas 1 (*MDR1*, *multidrug resistance protein 1*) ou P-gp, transporta ativamente compostos de volta à luz intestinal. Esse processo limita a biodisponibilidade oral de vários fármacos (Cvetkovic et al., 1999; Ambudkar et al., 2003; Benet et al., 2003; Zhang et al., 2009).

Com frequência, o metabolismo dos fármacos na circulação porta (isto é, efeito de primeira passagem) exige o transporte de compostos nos hepatócitos através da família de proteínas do polipeptídeo transportador de ânions orgânicos (OATP, *organic anion transporting polypeptide*) e transportador de cátions orgânicos (OCT, *organic cation transporter*). A família de transportadores do transportador de ânions orgânicos (OAT, *organic anion transporter*) é responsável pela excreção renal de numerosos fármacos aniônicos de importância clínica, como antibióticos beta-lactâmicos, antiinflamatórios não-esteróides e análogos nucleosídicos antivirais. (Kim et al., 2003; Fei et al., 1998; Mikkaichi et al., 2004).

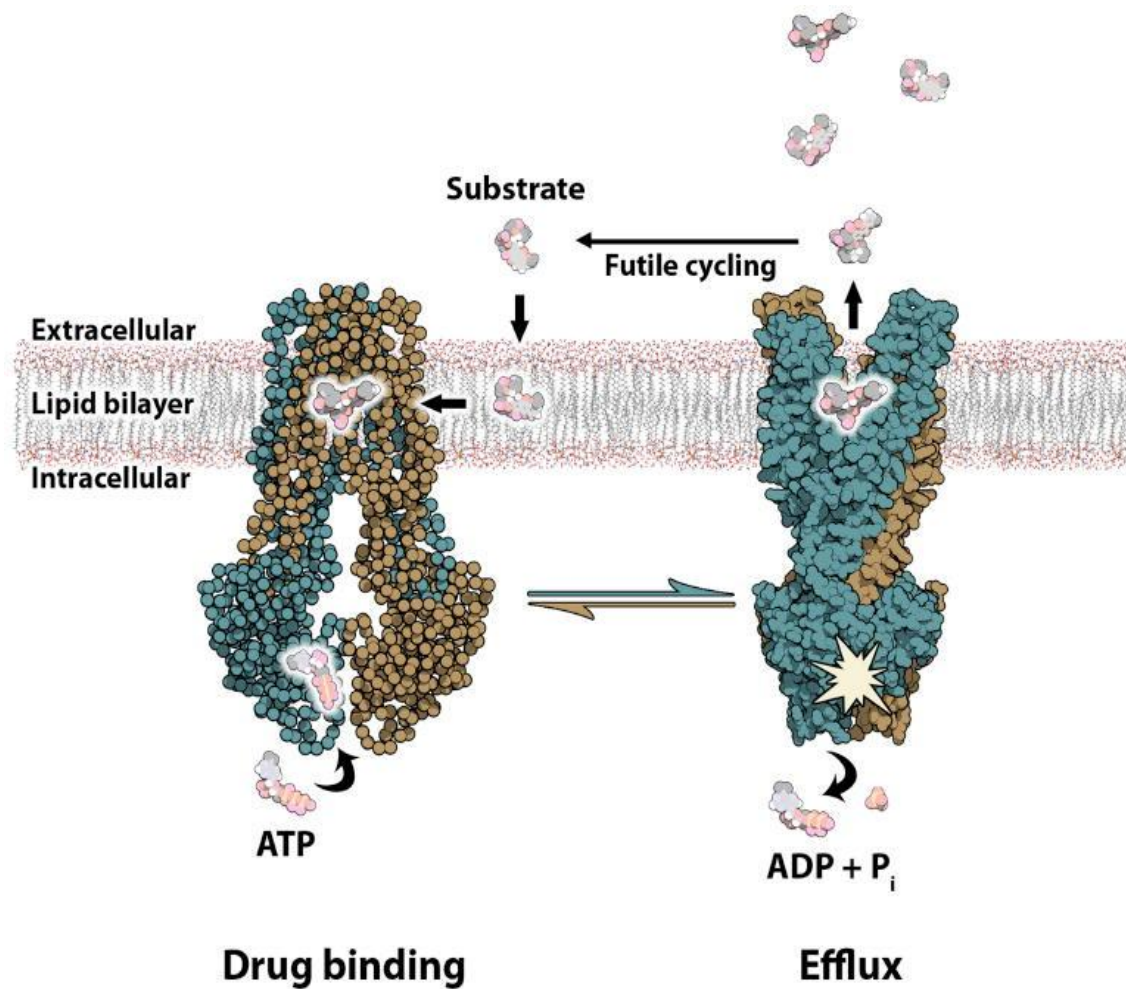
Os transportadores de fármacos também podem ser induzidos ou inibidos por outros fármacos. Assim, por exemplo, os antibióticos macrolídios podem inibir o *MDR1* e essa inibição pode levar a níveis séricos elevados de fármacos, como a digoxina, que são excretados pelo *MDR1*. O *MDR1* também é regulado ao nível da transcrição pelo PXR (*Pregnane X Receptor*), receptores responsáveis pela detecção da presença de substâncias tóxicas/estranhas e que regulam a expressão de proteínas envolvidas na desintoxicação do organismo. Em consequência, os fármacos que induzem à supra regulação das enzimas P450 através da via do PXR (por exemplo, 3A4 do P450) aumentam concomitantemente a transcrição do transportador de fármacos, *MDR1* (Guengerich, 2003; Wilkinson, 2005; Ho & Kim 2005; Zhang et al., 2009)

2.1.6 A Glicoproteína – P (P-gp)

A P-gp foi descrita pela primeira vez por Juliano e Ling como uma glicoproteína de membrana em células ovarianas de hamsters chineses expressando o gene *MDR1* em 1976 (Juliano & Ling, 1976). Uma vez clonado o gene e a estrutura analisada, revelou-se que a P-gp é um transportador de efluxo dependente de ATP de 170KD pertencente à superfamília dos transportadores ABC, (Gros et al., 1986; Higgins et al., 1997). Esta superfamília dos transportadores é codificada pelo gene *MDR1* e é constituída por proteínas ou glicoproteínas

dependentes de ATP que conferem resistência a diversas drogas (Gottesman et al., 1996; Leslie et al., 2001). A **Figura 1** representa a P-gp realizando sua atividade de efluxo mediante a hidrólise do ATP e ADP, caracterizando este processo como ativo.

Figura 1 – ATIVIDADE DE EFLUXO



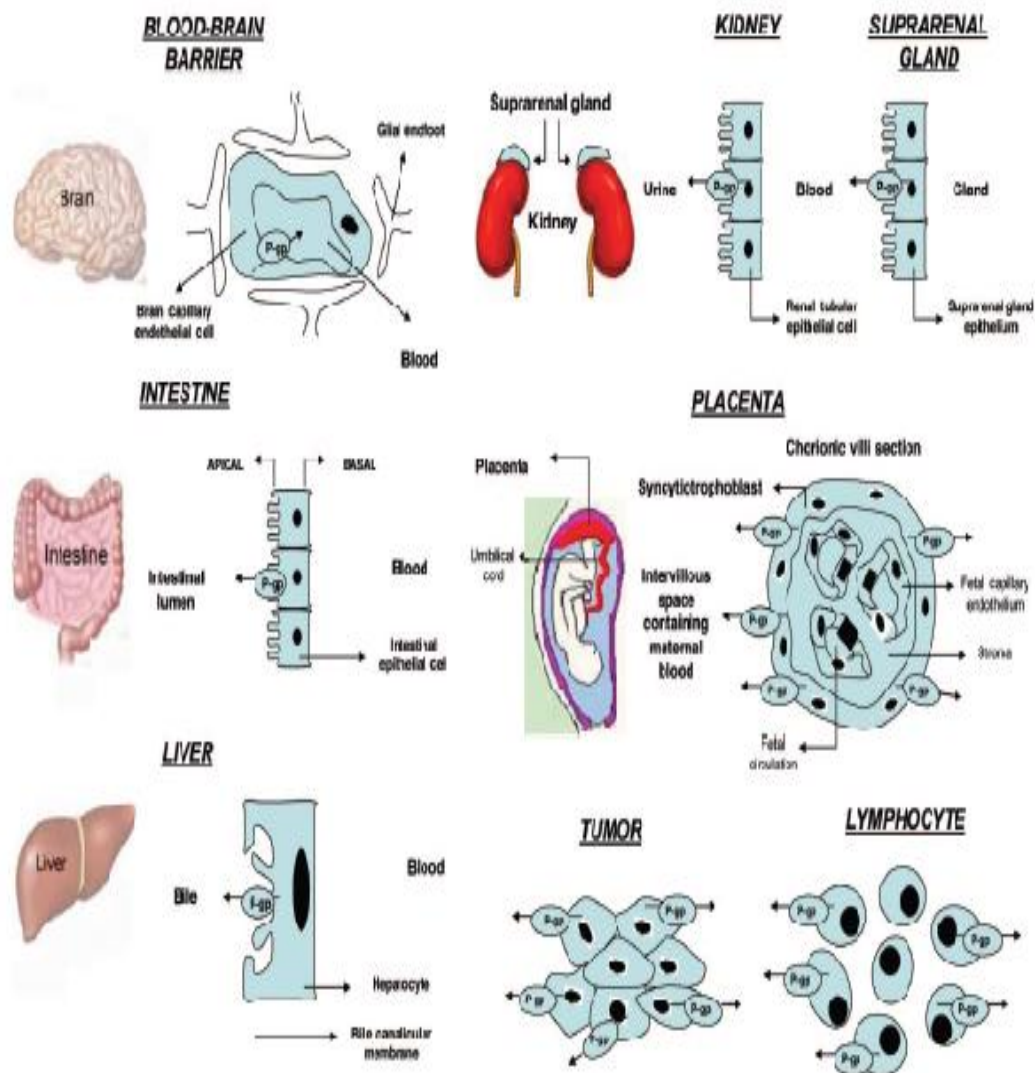
Fonte: Matthew et al., 2009; Trend Pharmacol. Sci. 30(10): 546-556

Figura 1: Mostra a localização transmembranar da P-gp e sua a atividade de efluxo dependente de ATP e da sua hidrólise que caracteriza esta atividade como um processo ativo de transporte de moléculas através da membrana.

A distribuição dos transportadores ABC vai além da associação com tratamentos de doenças, pois são encontrados no epitélio dos intestinos delgado e grosso, glândulas, placenta, nos rins, fígado, pâncreas, nas células endoteliais dos capilares do cérebro e testículos (Marchetti et al., 2007). Os transportadores P-gp localizados nos capilares do cérebro, são

também importantes na participação da barreira hemato-encefálica. Sendo assim, as glicoproteínas-P atuam também na desintoxicação do nosso organismo na proteção contra xenobióticos tóxicos através da excreção de metabólitos via bile, urina, lúmen intestinal e pela prevenção do seu acúmulo no cérebro, testículos e fetos, via expressão de P-gp na placenta (Marchetti et al., 2007) (**Figura 2**). Células do sistema imunológico também apresentam P-gp e diversos estudos sugerem um papel importante na resposta imunológica (Bertilsson, 2001; Park & James, 2003).

Figura 2



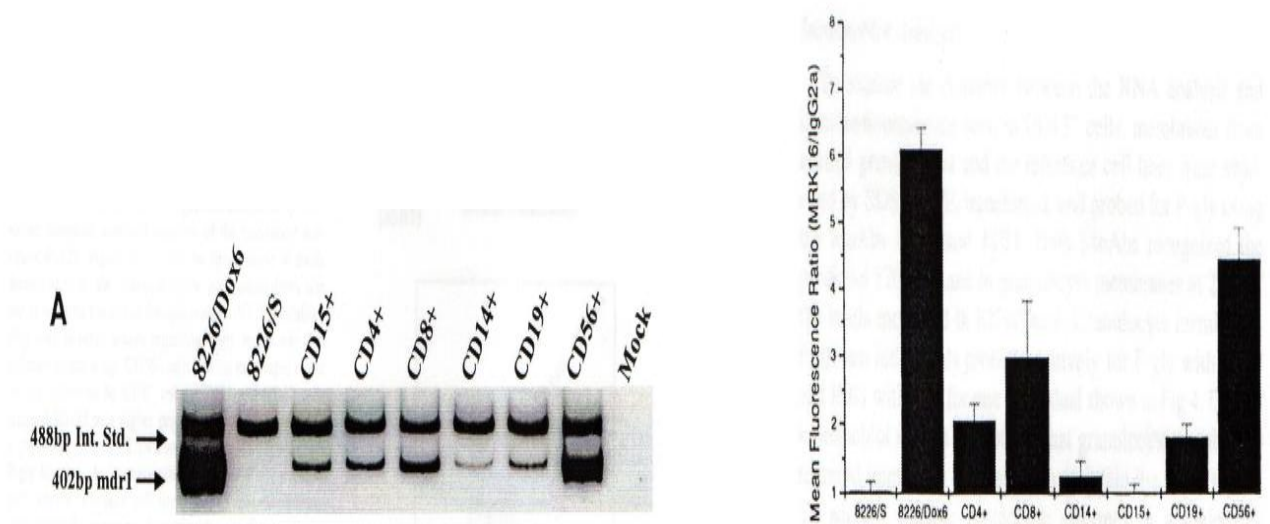
Fonte: Marchetti, Mazzani & Beijnen, 2007.

Figura 2: A P-gp, que foi primeiro associada à resistência a drogas em células tumorais, mas atualmente sabe-se que está distribuída por todo o organismo humano.

Destaca-se a glicoproteína P (P-gp) nas superfamílias ABC por estar envolvida na resistência a múltipla drogas apresentada por células tumorais (Szabó et al., 2000). Estudos “in vitro” com células transformadas detectaram um fenótipo de resistência múltipla a drogas frequentemente associadas com altas expressões de P-gp (Sato et al., 1990; Fojo et al., 1987; Siegsmund et al., 2002). Além disso, evidências indicam que variações na atividade e expressão da P-gp podem reduzir ou aumentar a biodisponibilidade de fármacos (König et al., 2013).

A expressão da P-gp em indivíduos saudáveis é muito pouco documentada, as informações disponíveis descrevem menos de 2% para linfócitos T CD4⁺, aproximadamente 3% para linfócito T CD8⁺ e menos de 1% para monócitos e granulócitos. Embora tenham baixa expressão de P-gp na membrana, monócitos e granulócitos expressam *mRNA* do gene *MDR1*. (Chaudhary et al., 1992; Drach et al., 1992; Walter et al., 1994). A falta da definição de valores normais da P-gp pode estar associada ao fato de que a mesma seja uma proteína que surge da membrana das células mediante a indução do PXR, estimulada pela presença de um xenobiótico (Zhang et al., 2009).

Figura 3



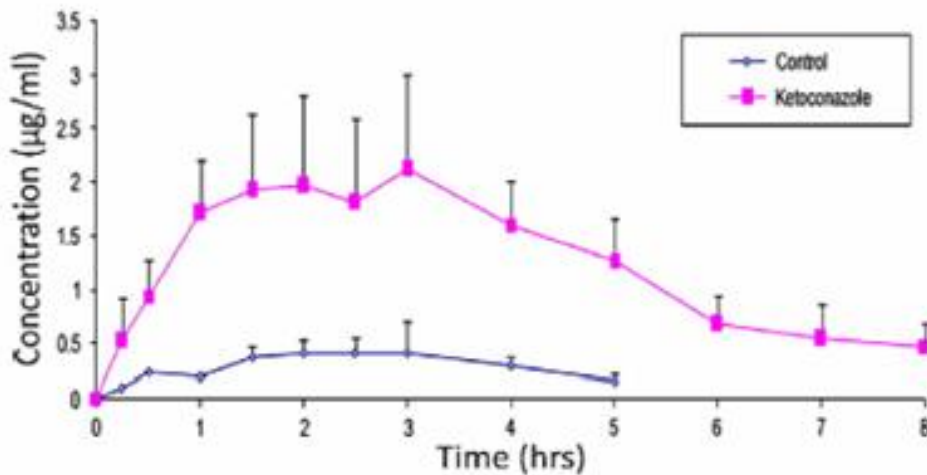
Fonte: Walter et al., 1994

A **Figura 3** demonstra a expressão de MDR1 *mRNA* e a expressão de membrana em células do sangue periférico de indivíduos normais.

2.1.7 A P-gp e as Interações de Drogas

As interações de drogas com os transportadores de membrana são descritos em diversos estudos como, por exemplo, as interações com opiatos. Estes compostos analgésicos têm sido estudados no sentido de mostrar sua interação com a P-gp. Está descrito que a metadona inibe o transporte da rodamina em células Caco-2 (Baker et al., 2006) e outros estudos demonstram também a capacidade da metadona de aumentar o acúmulo de substratos da P-gp (Beauverie et al., 1998; Boffito et al., 2002). Estudos com camundongos knockout para P-gp têm revelado que a metadona e a buprenorfina são transportadas pela P-gp e isto têm um papel importante na absorção de drogas e seu potencial na relevância para interação entre as drogas com valor preditivo clínico. (Beauverie et al., 1998; Boffito et al., 2002). Estas evidências foram reforçadas por um estudo clínico em humanos, desenhado para evidenciar o efeito da quinidina, um inibidor específico da P-gp, sobre a administração oral e intravenosa da metadona. Este estudo concluiu que a coadministração da quinidina eleva a concentração plasmática da metadona e conseqüentemente, resulta no aumento da resposta farmacodinâmica, elucidando o papel da P-gp na disponibilidade da metadona. Todas estas observações revelam a necessidade de testes capazes de predizer se uma determinada interação será bem ou mal sucedida (Kharasch et al., 2008).

Outro exemplo é o uso do Kaletra, combinação entre ritonavir e lopinavir, que tem uma associação que age sinergisticamente produzindo grande atividade antirretroviral. O ritonavir produz um grande aumento da curva farmacocinética do lopinavir através da inibição da P-gp e do CYP3A4. Também muito interessante é a interação que ocorre entre o lopinavir e o cetaconazol para o tratamento de doença oportunista, onde se observa o aumento da curva do lopinavir devido à inibição de ambas as proteínas **Figura 4** (Pal et al., 2011).

Figura 4

Fonte: Pal et al., 2011.

Figura 4 - Curva farmacocinética do lopinavir alterada pela interação com o cetaconazol devido à inibição da P-gp.

Um exemplo de indução descrito na literatura foi evidenciado através do pré-tratamento com dexametasona em ratos e seu efeito sobre o indinavir. Nesse caso, a dexametasona aumentou de 6 para 34% a taxa de metabolismo do indinavir na primeira porção do intestino do rato. Entretanto, em relação ao aumento de expressão de P-gp e CYP3A4 foi apenas de duas vezes e meia, demonstrando uma falta de correlação com o aumento do metabolismo do indinavir que foi de seis vezes (Bart et al., 2001).

O interesse pela possibilidade do uso de fluorquinolonas no tratamento da tuberculose suscetível a droga tem aumentado. Entretanto, o uso concomitante da rifampicina e moxifloxacina, testada em 16 voluntários que receberam 400mg de moxifloxacina por quatro dias e depois novamente foram tratados com moxifloxacina e mais 600mg de rifampicina por 10 dias, revelou que o uso concomitante da rifampicina diminuiu em 27% a concentração plasmática da moxifloxacina. Como a P-gp é induzida pela rifampicina, este exemplo também sugere a grande relação entre a P-gp e as interações droga-droga (Weiner et al., 2010). Dado a

grande quantidade de drogas e combinações para tratamento da tuberculose multirresistente é de fundamental importância o estudo da P-gp no tratamento desta doença infecciosa para avaliar o impacto das interações entre estas drogas e suas consequências. O **Quadro 2** mostra os substratos da P-gp e o **Quadro 3** seus inibidores conhecidos até 2006.

QUADRO 2 – SUBSTRATOS DA P-gp

SUBSTRATO	CLASSE
Actinomicina D	Antineoplásico
Adriamicina	Antineoplásico
Aldosterona	Esteróide
Amitriptilina	Antidepressivo
Amprenavir	Antiviral
Atorvastatina	Agente redutor do colesterol
Berberina	Outros
Bisantrene	Antineoplásico
Bunitronol	Antagonista β -adrenérgico
Calcein acetoxymethyl Ester	Agente citotóxico
Camptothecins	Agente citotóxico
Carvedilol	Antagonista β -adrenérgico
Celiprolol	Antagonista β -adrenérgico
Cetoconazol	Antimicrobiano
Cimetidina	Anti-histamínico
Colchicina	Agente citotóxico
Cortisol	Esteróide
Ciclosporina A	Imunossupressor
Ciclosporina	Imunossupressor
Dactinomicina	Antineoplásico
Daunorubicina	Antineoplásico
Debrisoquina	Antidepressivo
Dexametasona	Esteróide
Digotoxina	Digitálico
Digoxina	Digitálico
Diltiazem	Bloqueador de canais de Ca
Docetaxel	Antineoplásico
Domperidona	Butirofenona
Doxorubicina	Antineoplásico
Doxiciclina	Antimicrobiano
Emetine	Agente citotóxico
Eritromicina	Antimicrobiano
Etoposide	Antineoplásico
Fenitoína	Bloqueador de canais de Ca
Fenotiazinas	Tranquilizante
Fexofenadine	Anti-histamínico anti H1
Gleevec (STI-571)	Outros
Gramicidin D	Agente citotóxico
Gramicidina D	Agente citotóxico
Hoechst 33342	Outros
Homoharringtonine c (STI-571)	Outros
Imatinib	Antineoplásico
Indinavir	Antiviral
Irinotecan	Outros
Itraconazol	Antimicrobiano
Ivermectina	Lactona Macroclíca

Leupeptin	Peptídeo cíclico e linear
Levofloxacina	Antimicrobiano
Losartan	Simpatolítico
Lovastatina	Agente redutor do colesterol
Methotrexane	Antineoplásico
Metilprednisolona	Esteróide
Mibefradil	Bloqueador de canais de Ca
Mitomycin	Agente citotóxico
Mitoxantrone	Antineoplásico
Morfina	Opióide
Moxidectina	Lactona Macroclícica
NAc-Leu-Leu-Met-al	Peptídeo cíclico e linear
NAc-Leu-Leu-norLeu-al	Peptídeo cíclico e linear
Nelfinavir	Antiviral
Nonactina	Peptídeo cíclico e linear
Ondansetron	Antiemético
Paclitaxel	Antineoplásico
Pepstatina A	Peptídeo cíclico e linear
Prenyl-Cys methyl esters	Outros
Puromicina	Agente citotóxico
Quinidina	Bloqueador dos canais de Ca
Ranitidina	Anti-histamínico
Reserpina	Antagonista β -adrenérgico
Rodamina	Outros
Rifampicina	Antimicrobiano
Ritonavir	Antiviral
Saquinavir	Antiviral
Selamectina	Lactona Macroclícica
Sirolimus	Imunossupressor
Sprarfloxacina	Antimicrobiano
Tacrolimus	Imunossupressor
Talinolol	Antagonista β -adrenérgico
Taxol	Agente citotóxico
Teniposide	Antineoplásico
Terfenadina	Anti-histamínico anti H1
Tetraciclina	Antimicrobiano
Topotecan	Agente citotóxico
Triton X-100	Outros
Valinomycin	Agente citotóxico
Vecurônio	Bloqueador neuromuscular
Verapamil	Bloqueador de canais de Ca
Vimblastina	Antineoplásico
Vincristina	Antineoplásico
VP16	Outros
Yeast a-factor	Peptídeo cíclico e linear
99mC-SESTAMIBI a	Radioisótopo

Fonte: Ambudkar et al., 2006.

QUADRO 3 – INIBIDORES DA P-gp

INIBIDOR	CLASSE
Acetato de megestrol	Esteróide
Amiodarona	Antiarrítmico
Azidopina	Bloqueador de canais de Ca ⁺⁺
Biricodar (VX-710)	Outros
Bromocriptina	Outros
Carvedilol	Antagonista β-adrenérgico
Cefalosporinas	Outros
Cetoconazol	Antimicrobiano
Chloroquine	Outros
Ciclosporina A	Imunossupressor
Ciclosporina	Imunossupressor
Clorpromazina	Fenotiazídico
Cortisol	Esteróide
Cremophor EL	Detergentes e antifílicos
Curcumina	Fitoaquinóico
Dexniguldipine	Bloqueador dos canais de cálcio
Dexverapamil	Bloqueador dos canais de cálcio
Dihydropiridines	Outros
Dipyridamole	Outros
Disulfiram	Agente antiálcool
Eritromicina	Antimicrobiano
Fenotiazínicos	Tranquilizantes
FK 506	Imunossupressor
Fluoxetina	Antidepressivo
GF-902128	Outros
GG918	Outros
Grapefruit juice	Outros
Indinavir	Antiviral
Ioimbina	Antagonista α-adrenérgico
Itraconazol	Antimicrobiano
Ivermectina	Lactona macrocíclica
Metadona	Opióide
Nicardipine	Droga cardíaca
Nifedipine	Bloqueador de canais de Ca ⁺⁺
Paroxetina	Antidepressivo
Pentazocine	Opióide
Progesterone	Esteróide
Quinacrine	Outros
Quinidina	Bloqueador dos canais de Ca ⁺⁺
Reserpina	Bloqueador dos canais de Ca ⁺⁺
Retanavir	Antiviral
Saquinavir	Antiviral
Several neuroleptics	Outros
Solutol HS15	Detergentes e anfílicos
St. John's wort	Antidepressivo
Tamoxifeno	Antineoplásico
Tariquidar	Outros
Terfenadine	Antagonista do receptor H1
Trifluoperazine	Antagonista da calmodulina
Tween 80	Detergentes e anfílicos
Valinomycin	Peptídeo cíclico
Valspodar (PSC-833)	Outros
Verapamil	Bloqueador de canais de Ca ⁺⁺

Fonte: Ambudkar et al., 2006

2.2 FARMACOGENÉTICA E A EXPRESSÃO PROTÉICA

2.2.1 A Expressão de Proteínas

A análise proteômica engloba conhecimentos e técnicas capazes de não só identificar um conjunto de proteínas produzidas por uma célula, mas também de revelar as interações e interdependência dos processos biológicos. Ela constitui uma nova linguagem que deve ser aprendida para desvendar o significado do complexo mapa da síntese (Patton, 2002). Ao contrário do genoma de um organismo, transferido integralmente durante a replicação celular e que, portanto, tem caráter permanente, o proteoma, entendido como o conjunto de proteínas produzidas por uma célula, é extremamente dinâmico, dependendo do estágio de desenvolvimento e diferenciação, assim como das condições específicas e temporais do ambiente (Yamagida, 2002; Yamagida et al., 2001). A célula como unidade básica da vida possui a característica fundamental de preservar sua integridade e individualidade, interagindo com o meio em que vive e trocando continuamente informações com o meio externo. O seu funcionamento e sobrevivência dependem crucialmente deste fluxo de informações, sendo a expressão de proteínas com funções específicas a forma mais comum da resposta celular aos estímulos externos (Klose, 1999; Yamagida, 2002; Yamagida et al., 2001).

Um dos fundamentos da biologia moderna é que existe uma relação única entre a sequência gênica contida no DNA e o resultado da expressão gênica, isto é, cada gene correspondente a uma ou mais proteínas expressas pela maquinaria de transcrição e tradução, destinadas a cumprir determinada função na célula (Gromov et al., 2002). A função codificada no gene é realizada pela proteína ou proteínas associadas a ele, entretanto a palavra gênica, expressa pelas proteínas tem múltiplas dimensões dependendo tanto de modificações pós-tradução como condições físico-químicas do meio celular (Pawson et al., 1997). Outra hipótese fundamental é de que a sequência primária dos aminoácidos de uma proteína codificada no genoma corresponde a uma única conformação funcional (Vitkup et al., 2001). De fato, a função de uma proteína está intimamente relacionada com sua estrutura no espaço tridimensional, funcionando através do que se convencionou chamar de mecanismos do tipo chave-fechadura, em que o encaixe entre unidades interagentes deve ser realizado de forma perfeita no espaço tridimensional, definindo exatamente a especialidade da interação (Vitkup et al., 2001). Desta forma, os dois postulados se complementam, relacionando ao gene, sequência, forma e função. Pequenas ou grandes mudanças químicas e conformacionais das proteínas, induzidas por modificações pós-tradução ou pelas condições físico químicas dos

compartimentos celulares servem como resposta a estímulos, interagindo, assim, como sistema de sinalização da célula (Ideker et al., 2001). Assim, o estudo da expressão das proteínas constituem na verdade o estudo de expressão gênica que pode ser realizado por citometria de fluxo.

2.2.2 Uso da Citometria na Farmacogenética

A citometria de fluxo tem sido vastamente utilizada na avaliação da resistência a múltiplas drogas na quimioterapia das leucemias em humanos desde 1994, através da incorporação de Rho 123 e da modulação pela CSA, medindo a atividade de efluxo pela P-gp, onde em geral são avaliadas as médias de fluorescência da Rho123 após o seu acúmulo intracelular e a taxa de efluxo após um período de incubação sem a presença da Rho 123, com e sem a presença do inibidor específico da P-gp, em gráficos monoparamétricos de 1024 canais e deste modo pode-se determinar a atividade de efluxo da célula quando há uma intensidade de fluorescência maior na presença do inibidor (Lee et al., 1994; Beck et al., 1996; Pallis et al., 1999).

Para ser adequado para um ensaio de citometria de fluxo em farmacogenética, um marcador de P-gp deve satisfazer vários critérios: 1) que deve ser transportada, principalmente, pela bomba de Pgp, 2) ele deve ser um bom marcador fluorescente, e 3) a sua velocidade de difusão deve ser passiva e baixa em comparação com a taxa de transporte ativo mediada pela P-gp. Em estudos com ensaios em farmacogenética, a Dauromicina (DNR) tem sido utilizada para a determinação da retenção do fármaco celular (Ross et al., 1995; Baggetto et al, 1998) e para a avaliação do fenótipo da P-gp em amostras clínicas (Gheuens et al , 1997). A Rodamina123 é o marcador mais utilizado, devido às suas excelentes qualidades fluorescentes e a sua interação com grande número de substratos específicos da P-gp (Lampidis et al., 1985). Estudos até agora indicam que, pelo menos, dois locais de ligação de substrato estão presentes no transportador de P-gp, incluindo aqueles para rodamina123 (Shapiro & Ling, 1997) e para o verapamil ou adriamicina (Wang et al., 1998). A afinidade de um modulador para a P-gp varia nestes dois locais. O local de ligação de DNR pode representar um único sítio no transportador P-gp (Wang et al., 1999) . Foi demonstrado que os inibidores conhecidos de P-gp ou substratos tais como a ciclosporina A, gramicidina, nicardipina, a quinidina, a progesterona, o verapamil, a terfenadina, tamoxifeno e podem afetar o efluxo da DNR (Wang et al., 1999). No entanto, os composto como o α -tocoferol

teve pouco efeito sobre o efluxo de DNR, sugerindo que estes compostos podem interagir com outros sítios de ligação, ou não têm qualquer efeito sobre este transportador Pgp (Wang et al., 1999). O DNR como alternativa a Rho123 tem vários bons atributos como um marcador de fluorescência. A sua retenção celular representa uma boa evidência de que os transportadores de P-gp podem ser efetivamente bloqueados, e o seu espectro de fluorescência a torna adequada para ensaios por citometria de fluxo. Concentrações de DNR entre 1 e 5 μM proporcionar fluorescência razoável para distinguir diferenças de potência de inibição para a maioria dos inibidores de P-gp (Wang et al., 1999).

A citometria de fluxo tem sido utilizada na pesquisa de expressão da P-gp em estudos com animais experimentais e humanos (Babic et al., 2005; Vilas-Boas et al., 2011), na avaliação da atividade de efluxo da P-gp na infecção por *Helicobacter pylori* (Babic et al., 2005), na expressão de transportadores em células hematopoiéticas humanas (Christian et al., 2002), entre outros exemplos. Assim, o citômetro de fluxo se tornou uma ferramenta importante na farmacogenética através da avaliação da expressão do gene *MDR1* e a sua atividade.

A avaliação dos efeitos de interação de novas drogas utilizadas no tratamento da infecção pelo HIV “in vivo” tem sido realizada por citometria de fluxo. Foi possível determinar que enquanto a atividade de efluxo da Rho123 não foi afetada pelo Retalgravir, o Duranavir reduziu o efluxo da Rho 123 nos linfócitos de indivíduos saudáveis testados, demonstrando que droga atua sobre a expressão do gene *MDR1* (Tempestelli et al., 2013).

2.2.3 A Citometria de Fluxo

O citômetro de fluxo baseia-se no processo de através da formação de vácuo. Adquirir células ou partículas por aspiração de uma suspensão e em ato contínuo passar estas células por uma câmara chamada de câmara de fluxo, que faz com que mantém as células centralizadas num fluxo contínuo de uma solução tamponada de forma que estejam ordenadas uma atrás da outra, de modo que uma célula de cada vez passe pelo laser. Uma vez interceptada pelo laser, dois tipos de análises físicas ocorrem: primeiro, a luz sofre interferência de acordo com as características morfológicas e estruturais da célula e nos fornece o *Forward Scatter* (FS) que se refere ao tamanho e a outra informação morfológica da célula é fornecida pelo *Side Scatter* (SS) que refere-se a complexidade ou granulosidade da célula ou partícula (Shapiro, 1985; Melamed et al., 1979; Bertho et al., 2000). Quando

previamente coradas com fluorocromos, e uma vez excitadas pelo laser, emitem luz de acordo com suas características fluorescentes dos fluorocromos e são utilizadas para se a fenotipagem ou identificação de marcadores de membrana, aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células (Shapiro, 1985; Melamed et al., 1979; Bertho et al., 2000).

Um conjunto de lentes localizadas próximas da câmara de fluxo, onde ocorre a interceptação da célula ou partícula com o laser, coleta a luz dispersa e enviam-na para os fotomultiplicadores (PMTs) que transformas e amplificam os sinais luminosos em vários pulsos elétricos, os quais são proporcionais à quantidade de luz dispersa ou fluorescente recebida pelos PMTs. Para a seleção e captação destes sinais luminosos, filtros óticos são usados para selecionar determinados comprimentos de onda da luz incidente e deixar passar somente a luz de comprimento de onda que se deseja. Os sinais elétricos que são gerados pelos PMTs são convertidos em informações digitais, enviados para um computador e exibidos na tela do computador (Shapiro, 1985; Melamed et al., 1979; Bertho et al., 2000).

A maioria dos citômetros de fluxo utiliza lasers como luz estável, monocromática e de alta potência. Existem lasers sintonizáveis ou de emissão fixa, podendo ser refrigerados a água ou a ar. O laser de íon argônio é o mais empregado, por ter uma emissão a 488 nm, comprimento de onda muito utilizado para a excitação de vários fluorocromos tais como o FITC, PE, ECD, PerCP, PI, 7-AAD, anexina V, brometo de etídeo, laranja de acridina, pironina Y, fluo-3 (Shapiro, 1985; Melamed et al., 1979; Bertho et al., 2000).

Outros fluorocromos, como o Hoescht, a mitramicina e o APC, são excitados por lasers com outros comprimentos de onda, como os de UV ou de Hélio-Neônio (He-Ne). Torna-se, assim imprescindível o conhecimento do comprimento de onda de excitação do fluorocromo a ser utilizado para se certificar que tal equipamento seja capaz de lê-lo (Shapiro, 1985; Melamed et al., 1979; Bertho et al., 2000).

Os citômetros de fluxo produzem uma grande quantidade de informações que podem ser armazenadas em forma de histogramas (histogramas monoparamétricos de 256 ou 1024 canais, histogramas biparamétricos de 64 x 64). A citometria de fluxo só pode ser utilizada para células ou partículas em suspensão (Bertho et al., 2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo tem caráter descritivo, tendo sido realizado com pacientes em tratamento para tuberculose multirresistente, acompanhados no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ) no período de 2009 a 2013, tendo como parâmetro principal a resistência simultânea à Rifampicina e Isoniazida no teste microbiológico de sensibilidade a drogas. O método de pesquisa descritivo tem como características observar, registrar, analisar, descrever e correlacionar fatos ou fenômenos sem manipulá-los, procurando descobrir com precisão com que frequência este fenômeno ocorre e sua relação com outros fatores (Lakatos & Marconi, 2010).

3.1.2 Critérios de Inclusão

1. Indivíduos do sexo feminino ou masculino com diagnóstico laboratorial confirmado para tuberculose, incluindo o teste de sensibilidade aos medicamentos durante o período estudado.
2. Ser maior de 18 anos de idade ou, em caso de indivíduos menores de idade, ter a aprovação por escrito do responsável direto, e estar presente em todas as consultas e procedimentos.
3. Assinar voluntariamente o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes de ingressar no estudo e após explicação detalhada da natureza do estudo. Nos casos de incapacidade do paciente, o seu representante legal assinou em seu lugar.
4. Pacientes com falência ao tratamento contra o *M. tuberculosis* documentada por realização de cultura para micobactérias e com identificação das cepas bacterianas resistentes aos antibióticos, seguindo os critérios estabelecidos pelo Guia de Vigilância Epidemiológica (Ministério da Saúde, 2011).

3.1.3 Critérios de Exclusão

1. Pacientes não diagnosticados com tuberculose multirresistente.
2. Pacientes co-infectados com o HIV.
3. Pacientes que não concordaram em assinar o TCLE.
4. Pacientes que apresentaram colonização por TB sensível ao TSA (teste de sensibilidade aos antibióticos).

3.1.4 Características dos pacientes que participaram do estudo

Foram coletadas amostras de sangue de 26 pacientes que estavam em tratamento para TBMR no ambulatório do IPEC/Laboratório de Pesquisa Clínica em Micobacterioses. Esse número de pacientes corresponde a 52% do total de pacientes em terapia medicamentosa para TBMR no IPEC em 15.03.2013.

A população estudada foi constituída por 50% de cada gênero (13 homens e 13 mulheres). Do total de pacientes incluídos 11/26 (42,3%) eram de cor branca e 15/26 (57,7%) eram não brancos. A média de idade dos pacientes incluídos no estudo foi de 41,85 anos (Desvio Padrão de 18,5 anos), idade mínima de 16 anos e máxima de 85 anos. A mediana e a Moda foram 39 anos e 23 anos, respectivamente.

O esquema de tratamento da TBMR está demonstrado na tabela 1. A Estreptomicina pode ser substituída pela Amicacina caso o paciente já tenha sido tratado anteriormente com Estreptomicina ou seu teste de sensibilidade apresente resistência à Estreptomicina.

Antes do tratamento para tuberculose multirresistente, todos os pacientes foram previamente tratados por 6 meses pelo esquema RIPE com Rifampicina (R), isoniazida (I), Pirazinamida (P) e Etambutol (E) de acordo com o Manual do Ministério da Saúde.

Para analisar a correlação entre a expressão e atividade de efluxo da P-gp e o tempo de tratamento, os pacientes foram divididos em dois grupos, no momento da coleta do sangue: 1º grupo – foi constituído por pacientes que estavam em tratamento por até seis meses e o 2º grupo com mais de seis meses de tratamento.

Dividimos os pacientes em dois grupos em relação número de drogas no tratamento: 1º grupo - tratados com 3 drogas e o 2º grupo, tratados com mais que 3 drogas, na data da coleta de sangue.

Foram rejeitadas do estudo amostras de pacientes co-infectados com HIV, conforme o critério de exclusão do projeto. Além disso, várias drogas utilizadas no tratamento do HIV são inibidores ou indutores da P-gp.

3.1.5 Coleta da Amostra de Sangue

Uma única coleta de 10mL de sangue dos pacientes foi realizada após as orientações sobre o estudo e assinatura do TCLE, seguindo o fluxograma do ambulatório de tuberculose durante a visita médica de acompanhamento do tratamento TBMR.

O material foi coletado na Seção de gestão de amostras e resultados do IPEC, em tubo heparinizado e mantido em temperatura ambiente até o processamento, não ultrapassando 24h após a coleta.

3.1.6 Determinação da Expressão da P-gp por Citometria de Fluxo

A determinação da por citometria de fluxo expressão da P-gp nas diferentes populações celulares foi realizada através do uso de anticorpos monoclonais: anti-CD243/P-gp, clone UIC2, anti- CD8, clone SFIC21ThysD3, anti-CD14, clone M5E2 obtidos a partir da Beckman Coulter (Fullerton, CA, EUA). Anti-CD3, clone UCTH1 e anti-CD4, clone RPTA-T4 (Biolegend San Diego CA). Foram utilizados em marcações duplas e triplas para determinação da P-gp em linfócitos, monócitos e granulócitos. Os testes foram realizados seguindo determinações do fabricante:

- 100µl de sangue periférico dos pacientes foram incubados com os anticorpos monoclonais por 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. Após o período de incubação, as hemácias foram lisadas utilizando a solução de lise Excellyse easy (Exbio, Vestec, República Checa). Após a lise das hemácias, as células foram analisadas no citômetro de fluxo XL-MCL da Beckman Coulter, com laser de 488nm para a excitação dos fluorocromos.

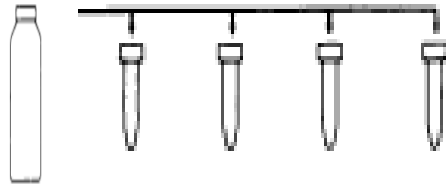
As análises das características físicas de tamanho e complexidade foram utilizadas para determinar as regiões referentes aos linfócitos, monócitos e granulócitos e seus respectivos fenótipos pela detecção da ligação anticorpos monoclonais.

3.1.7 Determinação da Atividade de Efluxo por Citometria de Fluxo

Para determinar a atividade de efluxo através da P-gp nas células do sangue periférico foi realizada a quantificação da retenção da fluorescência da Rho 123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por citometria de fluxo conforme Lee e colaboradores (1994): Quatro alíquotas de 100µl de sangue periférico dos pacientes foram incubadas por 30 minutos em uma solução de Rho 123 a 5ug/mL a 37°C, para o acúmulo da Rho123: 01 tubo sem adição de 10µM CSA, 01 tubo com adição de 10µM CSA, 01 tubo com adição de 1,0µg/mL Rifampicina e mais 01 tubo sem adição de Rho123, usado como controle sem marcação; as alíquotas foram lavadas duas vezes com Solução tampão (PBS 0,15mM) para retirada da Rho123 para a análise do efluxo; após a lavagem as amostras foram re-incubadas por 90 minutos em PBS com 5% de soro fetal bovino obtido a partir da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) a 37°C; após o período de incubação, as hemácias foram lisadas utilizando a solução de lise; as amostras foram imediatamente analisadas no citômetro, conforme demonstrado no **Fluxograma 01**.

FLUXOGRAMA 01 – ATIVIDADE DE EFLUXO POR CITOMETRIA DE EFLUXO

10 mL Sangue Total



-	+	+	+	Rho 123
-	-	+	-	CSA
-	-	-	+	RIF

1ª Incubação
30' 37°C.
(Acúmulo)

Lavagem
400xG, 10' (2x)



-	-	-	-	Rho 123
-	-	+	-	CSA
-	-	-	+	RIF

2ª Incubação
90' 37°C.
(Efluxo)



Lise



Leitura por citometria de fluxo

3.1.8 Análise Técnica da Determinação por Citometria de fluxo

Através da citometria de fluxo, os parâmetros utilizados neste estudo foram analisados através a partir da excitação de um laser de argônio de comprimento de onda de 488nm. Foram adquiridas 10.000 células por análise. Como utilizamos sangue total, no histograma de tamanho e complexidade foram delineados "gates" ou determinantes de campos contornando a população desejada: linfócitos, monócitos e granulócitos. A Rho 123 teve sua fluorescência determinada pelo canal FL1 com emissão de 520nm; a detecção da marcação com anticorpo monoclonal anti-CD243/PE pelo canal FL2 com emissão entre 578nm, anti-CD4/FITC pelo canal FL1 com emissão de 520nm; anti-CD8/ECD pelo canal FL3 com emissão de 620nm e anti-CD14 pelo canal FL1 com emissão de 520nm e CD3-PEDY647 pelo canal FL4 com emissão de 670nm. As expressões de P-gp nas células foram realizadas em histogramas biparamétricos (64x64) canais. A determinação da média de fluorescência da Rho123 foi realizada em histograma monoparamétrico (0 – 1024 canais).

A taxa de atividade de efluxo da P-gp foi determinada pela razão entre a diferença da média de fluorescência da Rho123 sem adição CSA dividido pela média de fluorescência com a adição CSA. Foram consideradas atividades de efluxo valores <1 da razão entre as médias de fluorescência. A quantidade de retenção intracelular da Rho123 pela adição da CSA foi correlacionada com a atividade de efluxo pela P-gp.

A taxa de atividade de efluxo induzida pela Rifampicina foi determinada pela razão entre a diferença da média de fluorescência da Rho123 sem adição Rifampicina dividido pela média de fluorescência com a adição Rifampicina. Foi considerada indução da atividade de efluxo valores >1 da razão entre as médias de fluorescência. A queda de retenção intracelular da Rho123 pela adição da rifampicina foi correlacionada com a atividade de efluxo pela P-gp.

3.1.9 Coleta de Dados dos Sujeitos de Pesquisa

Os dados laboratoriais e clínicos dos sujeitos de pesquisa foram inseridos no banco de dados no *software* SPSS 18.0 for Windows. Foram pesquisados os prontuários dos pacientes que estavam em tratamento no Ambulatório de Tuberculose Multirresistente do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIOCRUZ para a inserção no banco de dados.

As variáveis construídas foram:

- Demográficas: sexo, idade, raça;
- Clínicas: forma clínica da tuberculose, data do início e final do tratamento, drogas prescritas ao paciente, tempo de exposição dos pacientes as drogas prescritas, número de drogas utilizadas até 6 meses de tratamento e após 6 meses de tratamento);
- Laboratoriais: fenotipagem de CD3, CD4, CD8, CD14, CD243 nas diferentes populações, atividade de efluxo determinado pela inibição da ciclosporina e atividade de efluxo da rodamina e a indução da atividade de efluxo da Rifampicina.

Foi criada uma variável com dois subgrupos: tempo de tratamento até 6 meses e tempo de tratamento acima de 6 meses. Isso se justifica porque os 6 primeiros meses de tratamento da TBMR na fase intensiva são prescritas as mesmas drogas (6 meses de tratamento com Estreptomina, Etambutol, Levofloxacina, Pirazinamida e Terizidona); acima de 6 meses de tratamento são prescritas apenas três drogas na fase de manutenção (mais 12 meses de tratamento com Etambutol, Levofloxacina e Terizidona) totalizando 18 meses de tratamento.

Alguns pacientes utilizaram a Amicacina em decorrência da resistência no teste de sensibilidade a drogas para Espretomicina. Outra situação que requer o uso de Amicacina é quando o paciente teve histórico de uso de Espretomicina em tratamentos anteriores para tuberculose.

3.1.10 - Análise Estatística

O programa “Statistical Package for the Social Sciences 18.0 for windows” (SPSS Inc., Chicago IL) foi utilizado para entrada e análise de dados. A análise exploratória dos dados foi realizada com o *teste T* independente para análise das variáveis. As correlações foram determinadas graficamente por regressão e utilizando-se teste não paramétrico de Pearson. Em todos os casos as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ e com intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Diferenças na incorporação da rodamina 123 entre linfócitos, monócitos e granulócitos.

Todas as células incorporaram de forma satisfatória a Rho123 após o período de acúmulo que se refere à primeira incubação do sangue com a Rho123. Verificamos que a capacidade de incorporação, medida pela média de fluorescência, dos linfócitos, monócitos e granulócitos foi proporcional às características físicas das células. A incorporação foi maior nos granulócitos, seguido dos monócitos e linfócitos, reduzindo à medida que diminuía o tamanho e a complexidade da célula determinada pela citometria de fluxo (**Fig-5**).

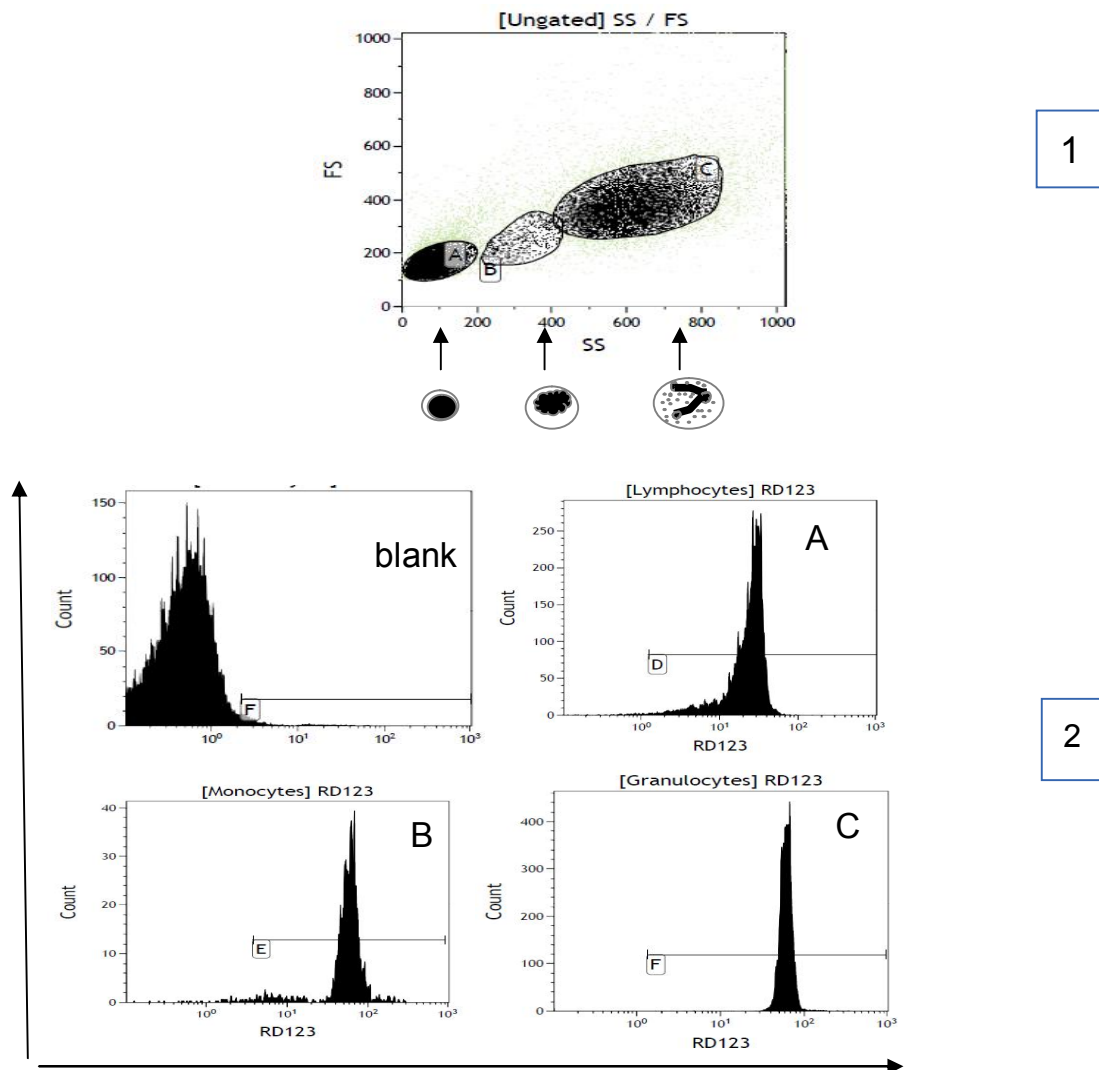


Fig. 5 – Gráfico biparamétrico, onde o eixo Y se refere ao tamanho das células e o eixo X à complexidade (1); Gráficos monoparamétricos em escala logarítmica de 0-1024 canais (2). A – Linfócitos, B – Monócitos e C-Granulócitos.

4.1.2 Determinação de efluxo usando Rho 123 com sangue total

Uma vez comprovada a viabilidade da incorporação da Rho123 pelas células com sangue total, verificamos que, na presença da RIF, reconhecida indutora de efluxo, houve um aumento da saída da Rho123, determinada pela perda média de fluorescência após o segundo período de incubação das células por 90 minutos. Por outro lado, na presença da CSA, reconhecida como inibidor da atividade da P-gp, houve uma diminuição da saída da Rho123.

FIGURA 06.

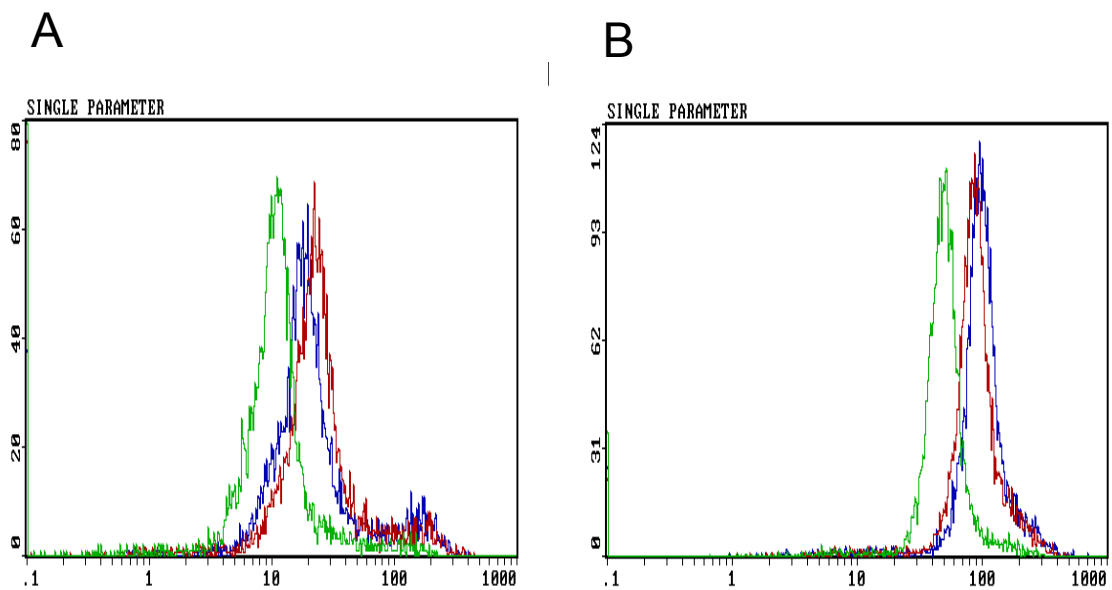


Fig.6 – Gráficos monoparamétricos em escala logarítmica de 0-1024 canais. **A** - Exemplo de células apresentando atividade de efluxo, onde se verifica maior intensidade da média fluorescência com a adição de CSA. Por outro lado, vemos redução desta fluorescência com a adição da rifampicina. **B**- Exemplo de ausência de efluxo, mas preservando a capacidade da rifampicina de induzir o efluxo. As linhas azuis representam as células incubadas somente com Rho123, as linhas vermelhas, a Rho123 + CSA e as verdes, Rho123+rifampicina.

4.1.3 Correlação da Atividade de Efluxo entre Linfócitos, Monócitos e Granulócitos.

Na **FIGURA 07** estão demonstradas as correlações da atividade de efluxo as três populações celulares do sangue periférico, com a finalidade de descrever a associação da atividade de efluxo entre as células do sangue periférico. A atividade de efluxo do monócito associa-se com mais intensidade com os linfócitos do que com os granulócitos e não há associação estatisticamente significativa entre linfócitos e granulócitos. Assim, os monócitos podem representar a atividade de efluxo nas células do sangue periférico, uma vez que sua atividade se relaciona com linfócitos e granulócitos.

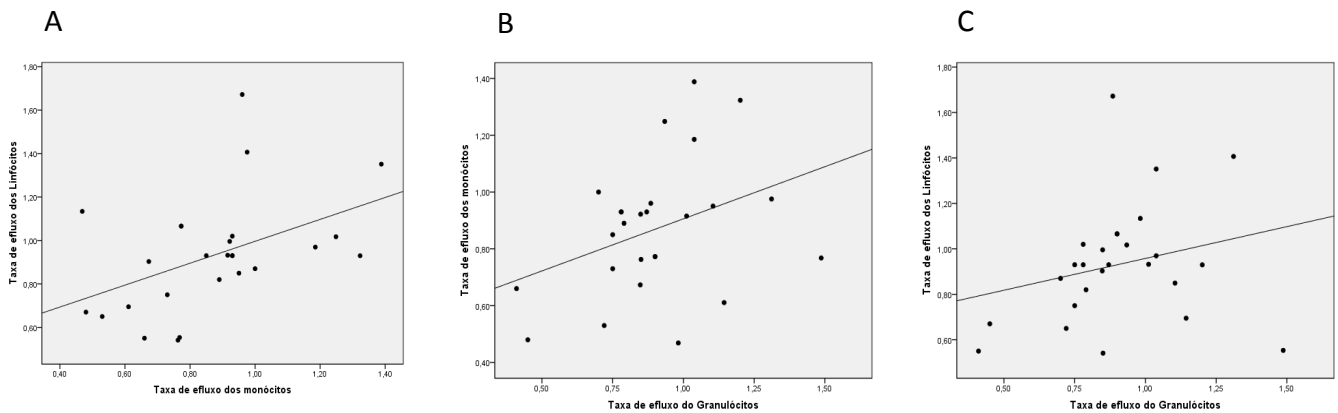


Figura 07- Observamos forte correlação entre monócitos e linfócitos ($P < 0,01$) - **A**, e também uma correlação entre monócitos e granulócitos ($P < 0,05$) - **B**. Não houve correlação entre linfócitos e granulócitos ($P = 0,063$) - **C**.

4.1.4 Análise da Expressão de P-gp entre as Populações Celulares

Uma maior expressão de P-gp foi observada nos granulócitos e nos monócitos como pode ser vista no quadro abaixo. Entre os linfócitos, uma maior expressão foi observada nos linfócitos T CD8⁺ em relação aos linfócitos T CD4⁺. A **FIGURA 08** é uma representação da análise por citometria da expressão de P-gp nas subpopulações de linfócitos T. A **TABELA 02** apresenta gráficos representativos desses resultados.

Tabela 02 - Expressão de P-gp entre as populações celulares

	CD4 ⁺ /P-gp ⁺	CD8 ⁺ /P-gp ⁺	Linf/P-gp ⁺	Mono/P-gp ⁺	Gran/P-gp ⁺
N	26	26	26	26	26
Média	4,04%	7,9%	10,4%	21,9%	26,2%
Erro Padrão	1,54	1,64	2,02	4,91	4,56
Desvio Padrão	7,9	8,3	10,2	25,1	23,2
Mediana	1,78	3,60	4,51	8,50	17,30

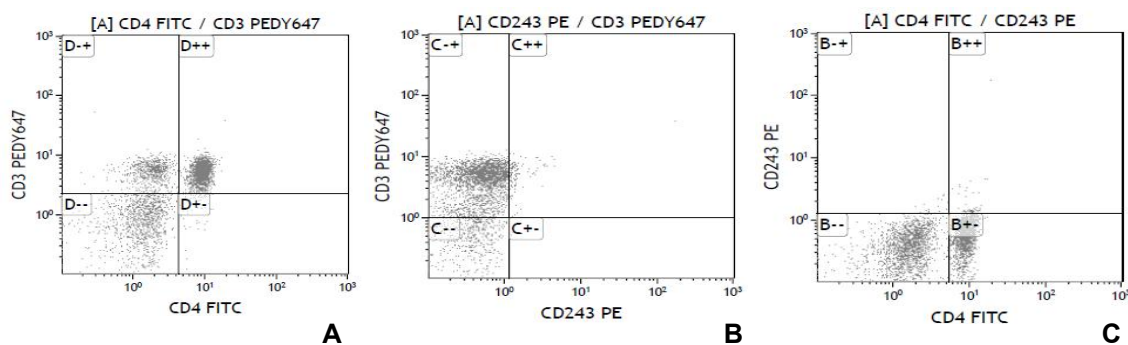


Figura 08 – Gráficos biparamétricos representativos da análise da expressão da P-gp em linfócitos através de tripla marcação (FITC/PE/PEDI647) por citometria de fluxo. **A** - Fenotipagem dos linfócitos T CD4⁺; **B**- linfócitos T P-gp⁺; **C** - linfócitos T CD4⁺/P-gp⁺.

4.1.5 Correlação da Idade do Paciente com a Expressão e Atividade da P-gp em Monócitos

Como a idade pode ser um fator relevante para a farmacocinética de vários tratamentos por diferentes medicamentos, correlacionamos a idade com a expressão de P-gp e sua atividade. Observamos uma correlação entre a expressão da P-gp em monócitos e a idade dos pacientes incluídos no estudo. Os nossos resultados regerem que o aumento da expressão da P-gp com o avanço da idade não se correlaciona com um aumento da atividade de efluxo.

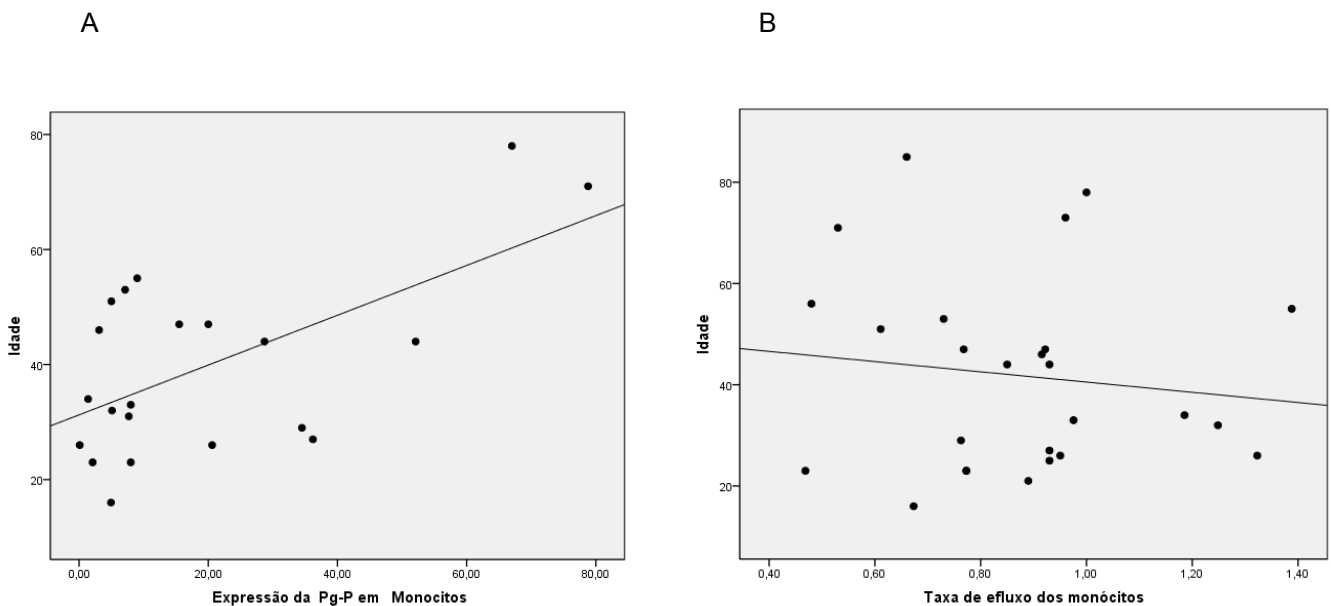


Fig. 9 - **A**- Gráfico demonstrando a correlação entre idade e expressão de P-gp ($P < 0,01$). **B**- Gráfico demonstrando a ausência de correlação da idade com a atividade de efluxo ($P = 0,461$).

4.1.6 Análise da cor da pele e sexo dos pacientes com expressão e atividade de efluxo da P-gp.

A figura - 10 mostra a comparação da expressão da P-gp entre linfócitos, monócitos e granulócitos. Observamos uma maior expressão da P-gp em linfócitos de pacientes de pele branca, quando comparados com não brancos sugestivo, mas não estatisticamente significativo. Não foram observadas diferenças entre mulheres e homens nas diversas análises realizadas em todas as populações celulares em relação à expressão ou atividade da P-gp.

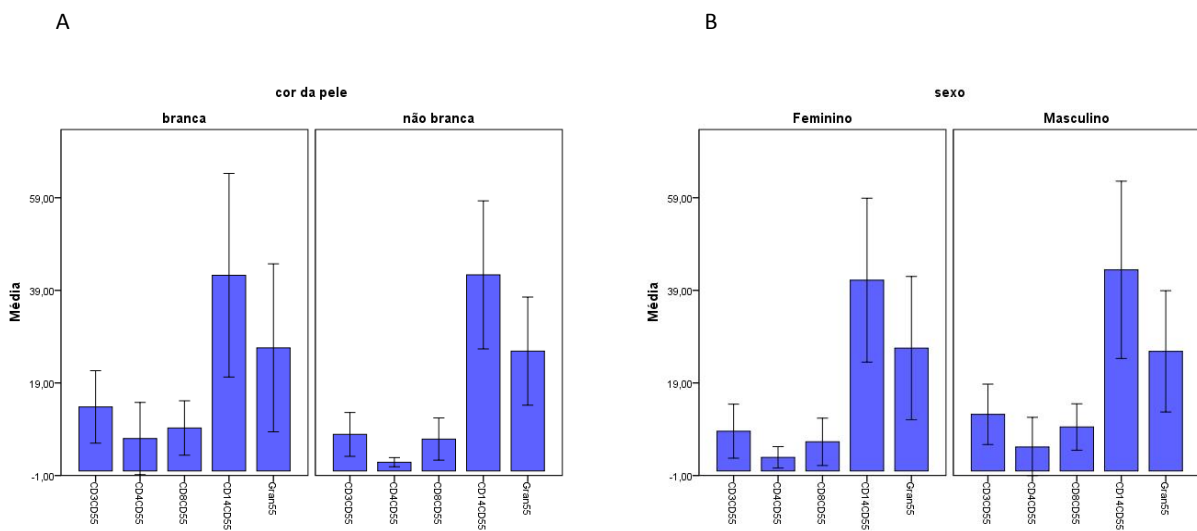


Fig10 – **A**- Gráfico representativo da expressão de P-gp em indivíduos brancos e não brancos; **B** - Gráfico representativo da expressão de P-gp mulheres e homens.

Em relação à taxa de efluxo dos linfócitos, monócitos e granulócitos e a cor da pele, não houve diferença estatisticamente significativa entre pacientes brancos e não brancos. Entretanto, observamos menor atividade de efluxo nos linfócitos e nos monócitos dos pacientes não brancos em relação aos brancos.

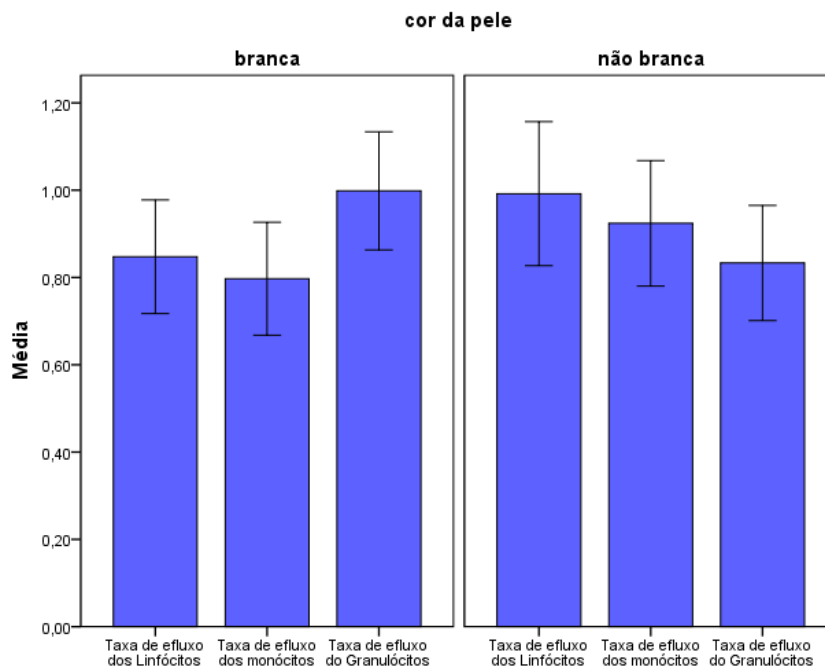


Fig.11 – A taxa de atividade de efluxo igual ou maior do que 1 corresponde a ausência de atividade de efluxo. O gráfico acima demonstra menor atividade de efluxo nos linfócitos de monócitos dos pacientes não brancos com a taxa média próximo de 1.

4.1.7 Relação do tempo de tratamento dos pacientes com expressão e atividade da P-gp.

Quando subgrupamos os pacientes de acordo com tempo de tratamento baseado no regime padronizado no guia do Ministério da Saúde brasileiro, observamos maior expressão de P-gp nos linfócitos dos pacientes com até 6 meses de tratamento quando comparado com os pacientes tratados a mais de 6 meses. Entretanto, observamos uma maior expressão da P-gp nos monócitos, mas nos pacientes com mais de seis meses de tratamento. Não observamos diferenças na expressão da P-gp nos granulócitos na comparação entre os grupos. Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação à atividade de efluxo.

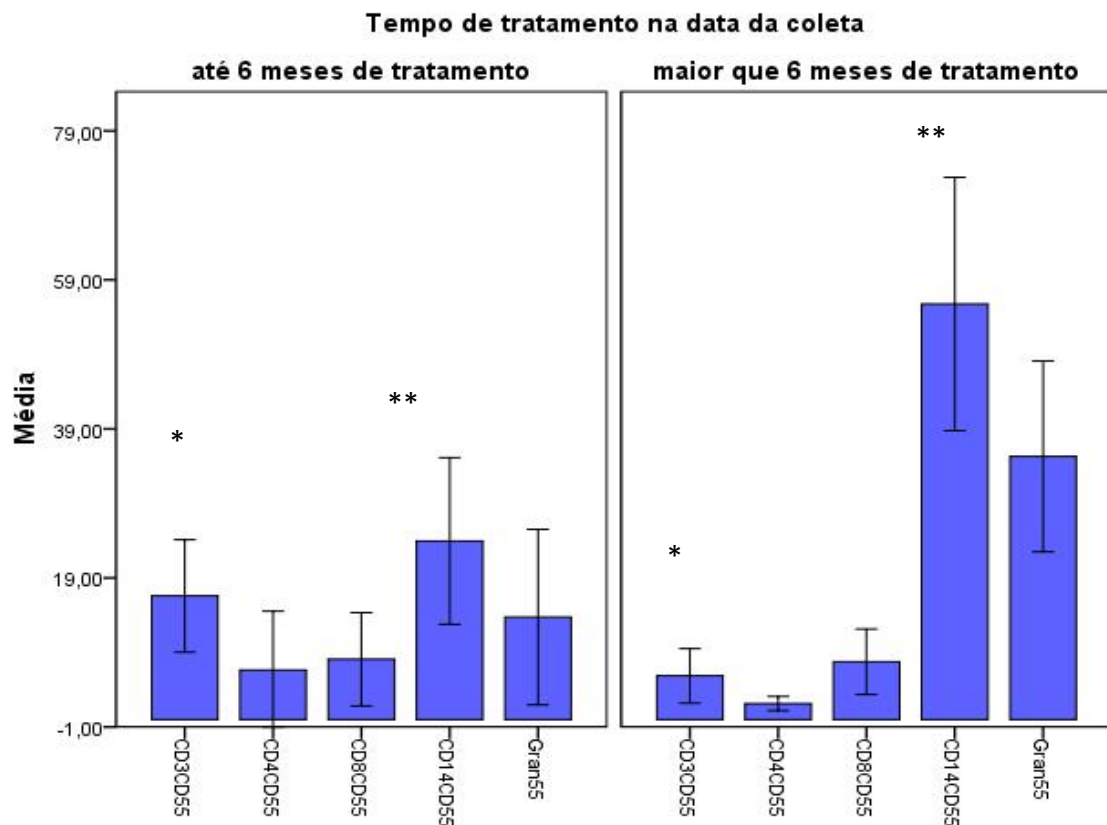


Fig 12 – (*) Foi observado maior expressão de P-gp nos linfócitos dos pacientes com até 6 meses de tratamento ($P < 0,01$). (**) Houve maior expressão da P-gp nos monócitos nos pacientes com mais de 6 meses de tratamento ($P < 0,05$).

4.1.8 Indução da expressão de P-gp nos monócitos pela Rifampicina

A rifampicina é uma reconhecida indutora de P-gp e neste sentido analisamos esta indução nas células do sangue periférico dos pacientes envolvidos nesse estudo. Observamos maior expressão de P-gp apenas nos monócitos.

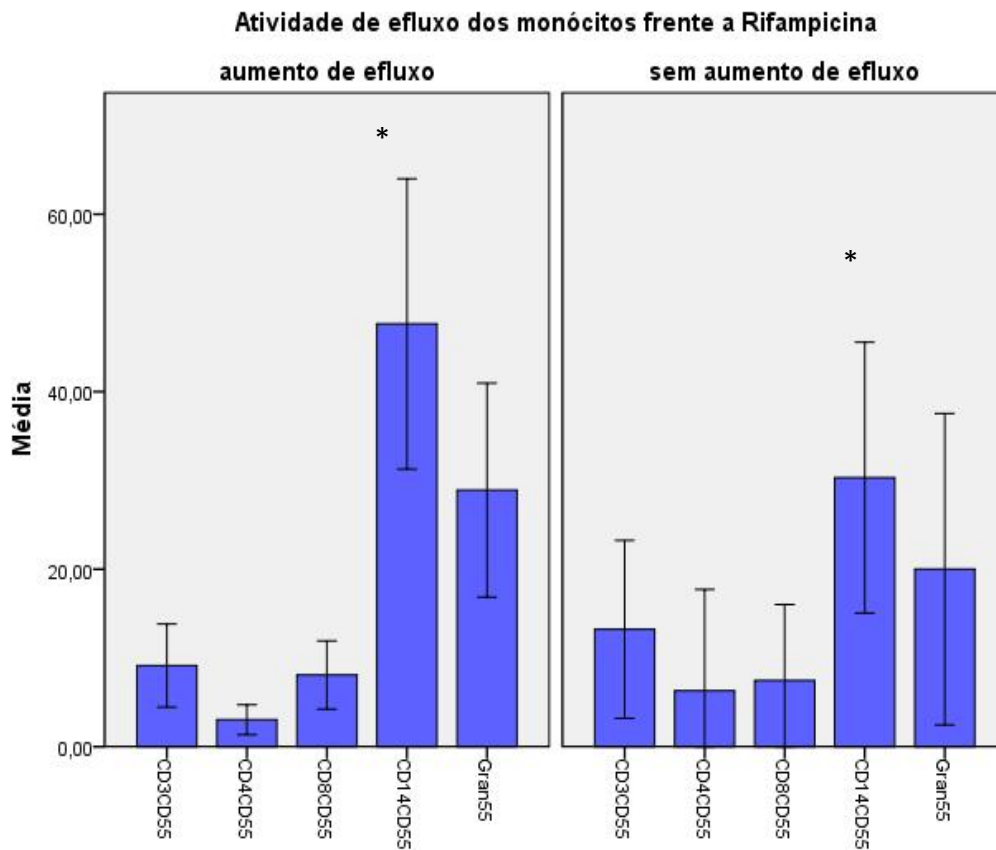


Fig.13 – Comparação da expressão da P-gp nas células do sangue periféricos dos pacientes TBMR associado a aumento da atividade de efluxo induzida pela RIF nos monócitos. (*) Aumento da expressão da P-gp nos monócitos dos pacientes que apresentaram aumento de efluxo induzida pela RIF nos monócitos.

4.1.9 Associação da expressão da P-gp em linfócitos dos pacientes com a atividade efluxo dos monócitos.

Observamos uma maior expressão de P-gp nos linfócitos de pacientes que apresentaram atividade de efluxo nos monócitos, sugerindo uma relevância da expressão da P-gp nos linfócitos dos pacientes TMBR.

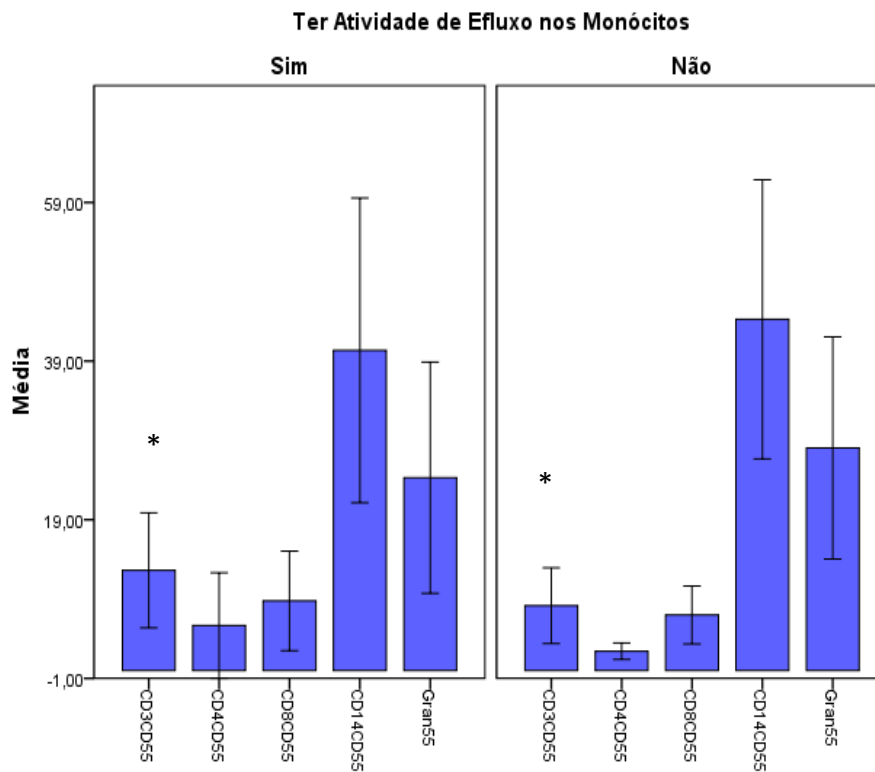


Fig.14 – (*) Associação da expressão da P-gp em linfócitos e aumento da atividade de efluxo em monócitos. **Sim** - apresentaram atividade de efluxo; **Não** – não apresentaram atividade de efluxo.

5 DISCUSSÃO

O regime de tratamento da tuberculose multirresistente caracteriza-se como longo, com uso de múltiplas drogas, com fortes efeitos adversos, podendo incluir neste regime drogas injetáveis como a estreptomicina, amicacina ou capreomicina (Ministério da saúde, 2011). O tratamento com drogas associadas e seus efeitos sinérgicos têm sido demonstrado principalmente em publicações relacionadas à infecção pelo HIV (Pal et al., 2011), mas há poucas publicações relacionadas a este assunto e a TBMR.

A determinação da expressão da P-gp e de sua atividade pode ser uma valiosa ferramenta para auxiliar o uso correto de drogas que possam ser seu substrato. O efeito de drogas que podem ter uma ação de inibição ou indução da P-gp afeta diretamente a biodisponibilidade de outras drogas em um regime de múltiplas drogas. A indução da expressão da P-gp tem sido associada a uma diminuição da biodisponibilidade de outras drogas, enquanto o uso de inibidores desta bomba de efluxo leva ao aumento dos níveis plasmáticos (König et al., 2013).

A expressão de uma proteína é um produto de um gene, que é sua interpretação e seu canal de atuação em uma célula para realização de uma atividade relacionada a uma função no organismo. Então, o que temos quando realizamos um estudo da expressão da P-gp por citometria de fluxo é a expressão fenotípica do gene MDR1, extremamente associado à multirresistência a drogas.

Nossos resultados demonstraram uma maior expressão da P-gp nos linfócitos de pacientes que estavam sob tratamento por até 6 meses em relação aos que estavam em tratamento por mais de 6 meses. Este resultado precisa de um olhar cuidadoso, porque até seis meses corresponde a primeira fase de tratamento intensivo. Depois de seis meses de tratamento há uma redução do número de drogas, mas o tempo de tratamento é maior e pode ter um efeito inibidor sobre a expressão da P-gp.

As análises por citometria de fluxo têm por característica principal a imunofenotipagem, sendo capaz de oferecer um panorama rápido para o acompanhamento da situação clínica de um paciente. O uso do sangue total para a determinação da atividade de efluxo oferece a vantagem de diminuir o uso de reagentes, menor manipulação, análise de múltiplas populações em um só teste e maior velocidade no processamento. Estas características podem habilitar esta técnica para o uso de auxílio à clínica. A inibição pela

Ciclosporina A e a indução pela Rifampicina, oferecem uma segurança de que o experimento foi bem-sucedido.

Os resultados da análise da expressão da P-gp neste estudo sugerem que o linfócito total seja a melhor população para o acompanhamento da expressão desta bomba de efluxo por citometria de fluxo. O aumento da expressão da P-gp nos linfócitos é interessante porque não podemos sugerir que a infecção pelo *M. tuberculosis* pode estar associada ao aumento da expressão de P-gp neste tipo celular como ocorre com os monócitos. A infecção pela *M. tuberculosis* induz a expressão desta glicoproteína nos promonócitos U1 e esta indução leva a uma diminuição da isoniazida intracelular (Gollapudi et al., 1994). Então, os linfócitos podem estar apenas sob influência das drogas utilizadas no tratamento, sendo por isso ótimos candidatos ao monitoramento do tratamento. Entretanto, demonstramos uma média de expressão da P-gp acima de 20% nos monócitos e nos granulócitos, enquanto em indivíduos saudáveis ocorre uma expressão de P-gp menor que 3% nestas células. Além disso, estas células apresentam expressão de *MDR1 mRNA* (Drach et al., 1992).

Dentre as drogas usadas no tratamento da tuberculose a Rifampicina é a mais bem caracterizada como indutora de interações medicamentosas e as drogas que são afetadas pela Rifampicina incluem anticoagulantes, agentes de hipoglicemia e contraceptivos (Chen & Raumont et al., 2006). Foi demonstrado que a média de eliminação de meia-vida do hexobarbital diminuiu 624-262 minutos e da tolbutamida 292-160 minutos após tratamento com rifampicina em pacientes com cirrose ou colestase (Chen & Raymond, 2006).

O uso de 600 mg / dia de Rifampicina causa um aumento de aproximadamente 3 vezes da eliminação do propranolol (Hermam et al., 1983). Estes estudos demonstraram que durante o tratamento concomitante com prednisolona, a rifampicina aumentou a depuração plasmática de prednisolona em 45% e redução da biodisponibilidade em 66% (McAllinster et al., 1983; Finch et al., 2002). O uso concomitante de rifampicina e isoniazida pode aumentar a toxicidade da isoniazida via metabolismo da acetil-isoniazida em monoacetil hidrazida (Chen & Raymond, 2006). A rifampicina também afeta a concentração plasmática da fluoroquinolona moxifloxacina, com uma redução de 27% da concentração média em uma curva de 0-24h, estudo realizado com 16 voluntários sadios que receberam 600mg de Rifampicina e 400mg de Moxifloxacina (Weiner et al., 2007). Apesar da vasta informação sobre a Rifampicina, não há muitas informações sobre as drogas associadas ao tratamento da TBMR.

O fator idade tem sido alvo de associação com a expressão de P-gp. Foi demonstrado que o aumento da expressão da P-gp em linfócitos tem correlação com o envelhecimento em

um estudo com 65 homens caucasianos saudáveis e que a atividade de efluxo não se correlaciona com a expressão da P-gp. Os autores questionam se somente o envelhecimento ou o envelhecimento associado ao uso de drogas por período prolongado poderia estar associado a este fenômeno (Vilas-Boas et al., 2011). Em nosso estudo, observamos uma correlação entre maior expressão de P-gp em monócitos e nos pacientes com idade mais avançada ($P < 0,01$), mas não houve correlação com atividade de efluxo destas células.

Segundo a literatura, a etnia é um fator a ser observado uma vez que muitos estudos demonstraram que a expressão/atividade da P-gp pode estar associada à cor da pele e sua origem étnica. (Burchard et al., 2003). Estudos têm comprovado diferenças significativas na frequência alélica do polimorfismo C3435T entre africanos, afrodescendentes americanos, brancos e japoneses. Africanos apresentam uma alta frequência (83%) para o genótipo C/C e afrodescendentes americanos 61% contra apenas 26% nos brancos (Schaeffeler et al., 2001). Neste estudo, analisamos a expressão da P-gp nos pacientes segundo a cor da pele e os dados sugerem que os indivíduos de pele branca apresentaram maior expressão de P-gp nos linfócitos $P=0,079$.

Nesta tese buscamos ampliar os horizontes do conhecimento da expressão do gene *MDR1* na Tuberculose Multirresistente através da determinação da sua expressão em um estudo descritivo. Dadas as características do regime de tratamento para este tipo de infecção foi e sempre será um desafio fazer associação como resultados definitivos. Há muitas variáveis que precisam ser analisadas e muito poucos estudos sobre estes pacientes e a expressão do gene *MDR1* na literatura, o que torna muito difícil discorrer e fazer análise de resultados anteriores.

A expressão da P-gp determinada nas células do sangue periférico revelou que os monócitos e os granulócitos têm uma expressão muito elevada em relação a indivíduos saudáveis. Este resultado é muito interessante visto que o *MDR1 mRNA*, está presente nos monócitos e nos granulócitos dos indivíduos saudáveis, porém a expressão é muito baixa nestes indivíduos (Chaudhary et al., 1992; Drach et al., 1992; Walter et al., 1994). O monócito, sem dúvida, enquanto célula alvo do *M. tuberculosis*, não desperta surpresa quanto à influência desta infecção e pode ser utilizada no acompanhamento, mas trata-se de uma célula que vai se diferenciar em macrófago e podemos vê-la como uma célula “indiferenciada” no sangue periférico. Este fato reforça a tendência da utilização dos linfócitos para o acompanhamento da expressão desta bomba de efluxo nos pacientes TBMR.

A expressão deste transportador na superfície dos linfócitos pode ser futuramente utilizada nas decisões clínicas, onde a quantificação de linfócitos CD3⁺/CD243⁺ pode ter no futuro a mesma importância para os pacientes TBMR quanto à quantificação dos linfócitos CD3⁺/CD4 e CD3⁺/CD8⁺ tem para os pacientes soropositivos para o HIV, guardadas as devidas proporções. Isto porque diferentemente dos marcadores CD3, CD4 e CD8, o CD243 não é uma molécula constitutiva e sim uma molécula expressa por estímulo, como as moléculas de ativação CD38 e HLA-DR nos linfócitos. Assim, sua expressão é muito valiosa por potencialmente não ser infectada pelo *M. tuberculosis*.

Dada miscigenação étnica da população brasileira, os resultados apresentados nesta tese sugerem que a forma de tratamento para diferentes grupos étnicos pode ser importante. Com o mapeamento do genoma humano, poucas diferenças foram observadas entre os grupos étnicos, mas há sim polimorfismos ou frequências polimórficas consideráveis que impactam no tratamento.

O achado da correlação da idade com a expressão da P-gp nos traz outro fator a ser considerado na farmacogenética. Uma maior expressão também sugere que há necessidade de mais estudos do impacto do tratamento sobre pessoas mais idosas.

A construção de uma base de dados com a expressão de P-gp em indivíduos saudáveis ou pacientes de tuberculose susceptível se mostra como um objetivo e um desafio ao mesmo tempo. Grupos terão que ser formados levando em consideração a etnia, idade, se está sob tratamento com medicamento de uso contínuo, comum na terceira idade ou no uso de contraceptivo, ingestão de álcool, tabagismo, gestação entre outros. O pareamento torna-se um desafio.

Outro objetivo futuro é o estudo do efeito de cada droga individualmente ou combinadas utilizadas no regime de tratamento da TBMR sobre a expressão e atividade da P-gp. Isto poderá auxiliar no entendimento dos efeitos sinérgicos entre as drogas, se há interações que podem beneficiar ou prejudicar o paciente.

6 CONCLUSÕES

1. A determinação da atividade de efluxo pode ser realizada com sangue total, seguindo as determinações do consenso do uso de Rho 123;
2. Houve uma boa correlação da atividade de efluxo entre os linfócitos e monócitos ($P < 0,01$), entre monócitos e granulócitos ($P < 0,05$), mas não entre linfócitos e granulócitos ($P < 0,063$);
3. Observou uma alta expressão de P-gp nos monócitos e granulócitos destes pacientes, diferentemente dos indivíduos saudáveis descritos na literatura.
4. Houve uma correlação entre a expressão de P-gp em monócitos e o aumento da idade dos pacientes ($P < 0,01$), mas sem correlação com atividade de efluxo;
5. Observamos uma maior expressão de P-gp em linfócitos nos pacientes que apresentaram uma maior atividade de efluxo nos monócitos ($P < 0,01$);
6. Houve uma maior expressão da P-gp em pacientes com até 6 meses de tratamento TBMR em relação àqueles que estavam há mais de 6 meses em tratamento TBMR ($P < 0,01$);
7. Os indivíduos de pele branca apresentaram uma tendência de expressarem mais P-gp nos linfócitos, mas sem significância estatística com um $P = 0,079$.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allorge D, Lorient MA. Pharmacogenetics or the promise of a personalized medicine: variability in drug metabolism and transport. **Ann Biol Clin** (Paris).62:499-511, 2004.

Ambudkar, S. V.; Kimchi-Sarfaty, C.; Sauna, Z. E.; Gottesman, M. M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. **Oncogene**, 22 (47): 7468-7485, 2003.

Ambudkar, S. V.; Kim J.W.; Sauna, Z. E.; The power of the pump mechanism action of P-glycoprotein (ABCB1). **Eur. J. Pharm. Sci.** 23: 392-400, 2006.

Andersson, T. Flockhart, D. A.; Goldstein, D. B.; Huang S.-M.; Kroetz, D. L.; Milos, P. M.; Ratain, M. J.; Thummel, K. Drug-metabolizing enzymes: evidence for clinical utility of pharmacogenomic tests. **Clin. Pharmacol. Ther.** 78 (6): 559-581, 2005.

Ayrton, A. Morgan, P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. **Xenobiotica**. 31 (8- 9), 469-497, 2001.

Babic, Z., Svoboda-Beusan, I., Kucisec-Tepes, N., Dekaris, D., Troskot, R. Increased activity of Pgp multidrug transporter in patients with *Helicobacter pylori* infection. **World J Gastroenterol**. 11(18):2720-2725, 2005.

Baggetto LG, Dong M, Bernaud J, Espinossa L, Rigal D, Bonvallet R and Marthinet E. In vitro and In vivo reversal of cancer cell multidrug resistance by the semi-synthetic antibiotic tiamulin. **Biochem Pharmacol** 56:1219–1228, 1998.

Bart PA, Rizzardi PG, Gallant S, Golay KP, Baumann P, Pantaleo G, et al. Methadone blood concentrations are decreased by the administration of abacavir plus amprenavir. **Ther Drug Monit.** 23(5):553–5, 2001.

Beck WT, Grogan TM, Willman CL, Cordon-Cardo C, Parham DM, Kuttesch JF, Andreeff M, Bates SE, Berard CW, Boyett JM, et al. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: Consensus recommendations. **Cancer Res.** 56:3010–3020, 1996.

Baker JR, Best AM, Pade PA, McCance-Katz EF. Effect of buprenorphine and antiretroviral agents on the QT interval in opioid-dependent patients. **Ann Pharmacother.** 40(3):392–6, 2006.

Beijnen JH, Schellens JHM. Drug interactions in oncology. **Lancet Oncol**;5:489–496, 2004.

Bjornsson, T. D.; Callaghan, J. T.; Einolf, H. J.; et al., The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab. Dispos.* 31 (7): 815-832; **J. Clin. Pharmacol.** 43 (5), 443-469, 2003.

Beauverie P, Taburet AM, Dessalles MC, Furlan V, Touzeau D. Therapeutic drug monitoring of methadone in HIV-infected patients receiving protease inhibitors. **AIDS.** 12(18):2510–1, 1998.

Benet, L. Z.; Cummins, C. L.; Wu, C. Y. Transporter-enzyme interactions: implications for predicting drug-drug interactions from in vitro data. **Curr. Drug Metab.** 4 (5): 393-398, 2003.

Bertho, A.L., Santiago, M.A., Da-Cruz, A.M., Coutinho, S.G. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Med and Biol Research**, 33: 317-325, 2000.

Bertilsson, P. M., P. Olsson, et al. Cytokines influence mRNA expression of cytochrome P450 3A4 and MDRI in intestinal cells. **J Pharm Sci** 90(5): 638-46, 2001.

Boffito M, Rossati A, Reynolds HE, Hoggard PG, Back DJ, DiPerri G. Undefined duration of opiate withdrawal induced by efavirenz in drug users with HIV infection and undergoing chronic methadone treatment. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 18(5):341–2, 2002.

Burchard EG, Ziv E, Coyle N, et al. The importance of race and ethnic background in biomedical research and practice. **N Engl J Med.** 348:1170–1175, 2003.

Buzková H, Pechandová K, Slanar O, Perlík F. Genetic polymorphism of cytochrome P450 and methods for its determination. **Prague Med Rep.** 2006;107(4):383-93.

Chaisemartin L, Loriot MA. Pharmacogenetics of anticancer drugs. **Pathol Biol (Paris).** 53:116-24, 2005.

Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. **Blood.** 80:2735–2739, 1992.

Chen J., Raymond K. Roles of rifampicin in drug-drug interactions: underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor. **Annals of Clin Microbiol and Antimicrobials**. 5 (3):1-11, 2006.

Chen, J.; Viola, M. V. A method to detect ras point mutations in small subpopulations of cells. **Analytical biochemistry**, New York, v. 195, n. 1, p. 51-56, 1991.

Christian W. Scharenberg, Michael A. Harkey, and Beverly Torok-Storb. The *ABCG2* transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. **Blood**. 99: 507-512, 2002.

Cvetkovic, M.; Leake, B.; Fromm, M. F.; Wilkinson, G. R.; Kim, R. B. OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. **Drug Metab. Dispos**. 27 (8): 866-871,1999.

De Miranda, S. S., A. R. Toledo, et al. Incidence of TB diagnosed in the emergency room of a teaching hospital in southeastern Brazil. **J Bras Pneumol** 35(2): 174-178, 2009.

Drach. D., Shourong. Z., Drach, J., Mahadevia, R., Gattringer, C. Huber, H., and Andreeff, M. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. **Blood**, 80: 2729-2734, 1992.

Fattinger K, Roos M, Vergeres P et al. Epidemiology of drug exposure and adverse drug reactions in two Swiss departments of internal medicine. **Br J Clin Pharmacol**;499:158 – 167, 2000.

Gheuens EE, van der Heyden SA, Elst HE, Van Oosterom AT and De Bruijn EA. Comparison of daunorubicin and Fluo-3 for detection of multidrug resistance in human tumor cells. **Cancer Detect Prev** 21:78–82, 1997.

Gollapudi S., Reddy M., Gangadharam P., et al., Mycobacterium Tuberculosis Induces Expression of P-glycoprotein in promonocytic U1 cells Chronically Infected With HIV Type 1. **Bioch. Bioph. Res. Commun**. 199 (3): 1181-1187, 1994.

Gottesman, M. M., I. Pastan, et al. P-glycoprotein and multidrug resistance. **Curr Opin Genet Dev**. 6(5): 610-7, 1996.

Guengerich FP. Cytochrome P450s, drugs, and diseases. **Mol Interv** ;3:194–204, 2003.

Gromov, PS., Ostergaard, M. Cellis, JE. Human Proteomic database: a powerful resource for functional genomics in healthy and disease. **Prog. in Bioph. & Mol. Biol.** 80: 3-22, 2002.

Gros P, Croop J, Housman D. Mammalian multidrug resistance gene: Complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. **Cell.**47:371–380,1986.

Herman RJ, Nakamura K, Wilkinson GR: Induction of propranolol metabolism by rifampicin. **J Clin Pharmacol.**16:565-9, 1983.

Higgins, C. F., Callaghan, R., Linton, K. J., Rosenberg, M. F., Ford, R. C. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. **Semin. Cancer Biol.** 8, 135-142,1997.

Hoffmeyer, S., O. Burk, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. **Proc Natl. Acad Sci U S A.** 97(7): 3473-8,1996.

Ho RH, Kim RB. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. **Clin Pharmacol. Ther.**78: 260–277, 2005.

Fei, Y. J.; Ganapathy, V.; Leibach, F. H. Molecular and structural features of the proton-coupled oligopeptide transporter superfamily. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.** 58: 239-261, 1998.

Fojo, A. T., K. Ueda, et al. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 84(1): 265-9, 1987.

Finch CK, Chrisman CR, Baciewicz AM: Rifampin and rifabutin drug interactions: an update. **Arch Intern Med.**162:985-92, 2002.

Ideker, T., Thorson, V., Ranish, JA., et al., Integrated genomic and proteomic analysis of a systematically perturbed metabolic network. **Science**, 292: 929-934, 2001.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochim Biophys Acta.** 455:152–162, 1976.

Kim, S. W., H. Y. Kwon, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by ginsenoside Rg(3). **Biochem Pharmacol** 65(1): 75-82, 2003.

Klose, J. Genotypes and fenotypes. **Electrophoresis**, 20:642-652, 1999.

König J. , Müller F., Fromm M. F. Transporters and Drug-Drug Interactions: Important Determinants of Drug Disposition and Effects. **Pharmacological Rev.** 65:944-966. 2013.

Kharasch ED, Bedynek PS, Walker A, Whittington D, Hoffer C. Mechanism of ritonavir changes in methadone pharmacokinetics and pharmacodynamics: II. Ritonavir effects on CYP3A and P- glycoprotein activities. **Clin Pharmacol Ther.** 84 (4):506–512, 2008.

Lakatos E.M.; Marconi, M.A. **Fundamentos de metodologia Científica.** 7ª Ed. São Paulo: Atalas , 2010.

Lee. J. S., Paull. K., Alvarez, M., Hose, C., Monks, A., Grever, M., Fojo. A. T.. and Bates, S. E. Rhodamine efflux patterns predict P-glycoprotein substrates in the National Cancer Institute Drug Screen. **Mol. Pharmacol.** 46: 627-638. 1994.

Leslie, E. M., R. G. Deeley, et al. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. **Toxicology** 167(1): 3-23, 2001.

Lampidis T, Munck J, Krishan A and Tapiero H. Reversal of resistance to rhodamine 123 in adriamycin-resistant Friend leukemia cells. **Cancer Res.** 45:2626–2631,1985.

Ma BB, Hui EP, Mok TS. Population-based differences in treatment outcome following anticancer drug therapies. **Lancet Oncol.**11:75-84, 2010.

Melamed, M.R.; Mullaney, P.F., Mendelson, M.L. - **Flow cytometry and sorting.** John Wilwy & sons., 1979.

McAllister WA, Thompson PJ, Al-Habet SM: Rifampicin reduces effectiveness and bioavailability of prednisolone. **Br Med J (Clin Res Ed).** 286:923-5, 1983.

Ministério da saúde (Brasil). **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil.** 284 p : il – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-85-334-1816-5, 2011.

Ministério da Saúde (Brasil). <http://portalsaude.saude.gov.br-2013>

Marchetti, S., Mazzanti, R., Beijnen, J., Schellens, J. H. M. Concise Review: Clinical Relevance of Drug–Drug and Herb–Drug Interactions Mediated by the ABC Transporter ABCB1(MDR1, P-glycoprotein). **The Oncologist**;12:927–941, 2007.

Mikkaichi, T., Suzuki, T.; Tanemoto, M., Ito, S.; Abe, T. The organic anion transporter (OATP) family. **Drug Metab. Pharmacokinet.** 19 (3):171-179, 2004.

Pal, D, Kwatra, D. Minocha, M. et al. Efflux transporters- and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. **Life Sci.** 88(21): 959–971, 2011 .

Pallis, M., Turzanski, J., Harrison, G., Wheatley, K. et al . Use of standardized flow cytometric determinants of multidrug resistance to analyse response to remission induction chemotherapy in patients with acute myeloblastic leukaemia. **Brit. J. of Haemat.** 104: 307–312, 1999.

Park, S. and C. D. James. Lanthionine synthetase components C-like 2 increases cellular sensitivity to adriamycin by decreasing the expression of P-glycoprotein through a transcription-mediated mechanism. **Cancer Res.** 63(3): 723-727, 2003.

Pawson, T., Scott JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. **Science**, 278: 2075-2080, 1997.

Patton, WF. Detection technologies in proteome analysis. **J. of Chromat. B**, 771: 3-31, 2002.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J. **Rang & Dale Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier. 848 p, 2007.

Reiss, J.; Krawczak, M.; Schloesser, M.; Wagner, M.; Cooper, D. N. The effect of replication errors on the mismatch analysis of PCR-amplified DNA. *Nucleic acids research*, **Oxford**, v. 18, n.4, p. 973-978, 1990.

Regitano, L. C. A.; Niciura, S. C. M.; Ibelli, A. M. G.; Gouveia, J. J. S. **Protocolos de biologia molecular aplicada à produção animal**. São Carlos: Embrapa, 72 p, 2007.

Ross DD, Doyle LA, Yang W, Tong Y and Cornblatt B. Susceptibility of idarubicin, daunorubicin, and their C-13 alcohol metabolites to transport-mediated multidrug resistance. **Biochem Pharmacol** 50:1673–1683, 1995.

Saiki, R. K. Bugawan, T. L.; Horn, G. T.; Mullis, K. B. Saiki, R. K.; Bugawan, T. L.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. **Nature**, London, v.324, n.6093, p.163-166, 1986.

Sato, H., H. Preisler, et al. MDR1 transcript levels as an indication of resistant disease in acute myelogenous leukaemia. **Br J Haematol** 75(3): 340-5, 1990.

Shapiro, H.M. - **Practical flow cytometry**. Alan R. Liss, Inc., 1985.

Shapiro AB and Ling V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. **Eur J Biochem** 250:130–137, 1997.

Siegsmond, M., U. Brinkmann, et al. Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. **J Am Soc Nephrol**. 13(7): 1847-54, 2002.

Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, Schwab M. Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. **Lancet** 4;358 (9279):383-4, 2001.

Sterky F, Lundeberg J. Sequence analysis of genes and genomes. **J. of biotech**. Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 1-31, 2000

Szabó D, Keyzer H, Kaiser HE, Molnár J. Reversal of multidrug resistance of tumor cells. **Anticancer Res**. 20(6B):4261-4274, 2000.

Tempestilli M, Gentilotti E, Tommasi C, Nicastrì E, Martini F, De Nardo P, Narciso P, Pucillo LP. Determination of P-glycoprotein surface expression and functional ability after in vitro treatment with darunavir or raltegravir in lymphocytes of healthy donors. **Int Immunopharmacol**. 2013 Aug;16(4):492-7.

Ueda, Z., ABC protein protect the human body and maintain optimal health. **Biosci. Biotech. Biochem**. 75 (3): 401-409, 2011.

Valasek M A, Repa J J. The power of real-time PCR. **Adv. Physiol. Educ**. 29:151-9, 2005.

Vilas-Boas, V., Silva R., Gaio, A. R. et al. P-Glycoprotein Activity in Human Caucasian Male Lymphocytes Does Not Follow its Increased Expression During Aging. **Cytometry Part A** 79A: 912919, 2011.

Viktup, D., melamud, E., Moul, J., Sander C. Completeness in structural genomics. **Nature Struct. Biol.** 8:559-566, 2001.

Walter T. K., Bernard W. F, Thomas M. G and and William S. D. P-Glycoprotein Expression and Function in Circulating Blood Cells From Normal Volunteers. **Blood**, Vol 83, No 9 (May 1): 2451-2458, 1994.

Wang L., Weinshilboum, R. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. **Oncogene** (2006) 25, 1629–1638, 2006.

Weiner M, Burman W, Luo CC, Peloquin CA, Engle M, Goldberg S, Agarwal V, Vernon A. Effects of rifampin and multidrug resistance gene polymorphism on concentrations of moxifloxacin. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2007 Aug;51(8):2861-6. Epub 2007 May 21.

Weiner, M., Peloquin, C., Burman W., et al., Effects of Tuberculosis, Race, and Human Gene *SLCO1B1* Polymorphisms on Rifampin Concentrations. **Antimicrobial Agents And Chemoth.** 10 (54): 4192–4200, 2010.

Wang G, Pincheira R and Zhang JT. Dissection of drug-binding-induced conformational changes in P-glycoprotein. **Eur J Biochem** 255:383–390, 1998.

Wang, E R. J, Christopher, N., Casciano, R. P.C., Johnson W.W. In vitro Flow Cytometry Method to Quantitatively Assess Inhibitors of P-glycoprotein. **Am Soc. Pharm. Exp. Therap.** 28:522-528. 1999.

Wilkinson, G. R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med* 352(21): 2211-21, 2005.

World Health Organization. **The Global Plan to Stop TB 2011-2015.** Genebra, Suíça, 2010.

Wright, A., M. Zignol, et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. **Lancet.** 30(373):1861-1873, 2009.

Wu, C.Y.; Benet, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. **Pharm. Res.** 22 (1), 11-23, 2005.

Yamagida, M. Functional Proteomics; Current Achievements. **J. of Chromatr. B**, 771: 89-106, 2002.

Yamagida, M. Miura Y. Yagasaki K et al., Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry analysis of protein detected by anti-phosphotyrosine antibody on two-dimensional-gels of fibroblastic cell lysates tumor necrosis factor-alpha stimulation. **Electroforesis**. 21: 1899- 8, 2000.

Yamagida, M., Shimamoto, A . Nishikawa K. et al., Isolation and proteomic characterization of the major proteins of the nucleolin-binding ribonucleoprotein complexes . **Proteomics** 1: 1390-1040, 2001.

Yuan, R.; Madani, S.; Wei, X. X.; Reynolds, K.; Huang, S. M. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. **Drug Metab. Dispos.** 30 (12): 1311-1319, 2002.

Zhang L., Strong JM, Qiu W., et al., Scientific Perspectives on Drug Transporters and Their Role in Drug Interactions. **Mol. Pharm.** 3 (1), 62-69, 2006.

Zignol M., Gemert W V, Falzon D. et al. **Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance In the world: an updated analysis, 2007–2010**. Bulletin of the World Health Organization.90:111-119D. doi: 10.2471/BLT.11.092585, 2012.

Zoppi M, Braunschweig S, Kuenzi UP et al. Incidence of lethal adverse drug reactions in the comprehensive hospital drug monitoring, a 20-year survey. 1974–1993, based on the data of Berne/St Gallen. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 56:427– 430, 2000.

ANEXO

Anexo 1 - Artigo submetido à publicação.

P-glycoprotein activity and its expression in white blood cells from whole blood in Multidrug Resistant Tuberculosis by flow cytometry: addressing aging, race, time of treatment.

Neves Jr I, Costa M.J.M, Carvalho-Neves S, DeCastro, L.

Laboratory of Pharmacogenetic Research, Evandro Chagas Institute - Oswaldo Cruz Foundation

E-mail adress: liane.castro@ipecc.fiocruz.br

Abstract

When two or more drugs are administrated, such interactions can cause additive, synergistic or antagonistic effects. multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) patients have treatment with drugs co-administrated and this drug interactions can have an efflux transporters effect. In addition, The drug transporters may undergo the effects of drugs and therefore change the bioavailability during the treatment and can cause failure. Among the drug transporters known there is transmembrane P-glycoprotein (P-gp). It is a 170 KDa transmembrane protein which is a product of multidrug resistance MDR1 gene. There are few studies about this protein called of efflux pump in MDR-TB. In this descriptive study we analyzed their expression and activity in monocytes, main cell related to the M. tuberculosis infection as well as lymphocytes and granulocytes from the whole peripheral blood by Flow cytometry. The efflux rate was determined through rhodamine 123 (Rho123) and P-gp expression by CD243 monoclonal antibody (clone UIC2). We analyzed 52 % of outpatient patients in MDR-TB treatment from Laboratory Research Mycobacteriosis Institute Evandro Chagas Clinical Research (IPEC). We analyze variables as age, race and treatment time at the time of blood collection and their correlation with P-gp expression and activity. Normally monocytes and Granulocytes haven't expression of the P-gp in healthy individuals, but this study revealed this expression in both cells from TBMR patients and we observed a correlation between the monocytes P-gp expression and aging (*Pearson, P < .01*). When we relate the efflux activity between cells, there was a high correlation between lymphocytes and monocytes (*Pearson p < .01*), Monocytes and granulocytes (*Pearson p < .05*), but not between lymphocytes and granulocytes (*Pearson p = .063*). Differences between white and nonwhite patients were observed also although without statistic difference. Besides, statistically significant increase of P-gp expression in lymphocytes was observed in patients with until 6 months of treatment than patients with above of six months of treatment (*P < .01*). This descriptive study is a contribution for understanding of the pharmacogenetic factors during MDR-TB.

Key Terms:

P-glycoprotein; MDR-TB; Rho 123 efflux; flow cytometry; whole blood; monocytes; granulocytes; lymphocytes.

Introduction

Transmembrane proteins, which transport small water-soluble organic molecules and ions across the plasma membrane are called transporter (Zhang et al., 2009). Transporter recognized their substrates specifically and with high affinity are considered most important for physiological and biological means, most are classified as an ABC transporter (Marchetti et al., 2007; König J. et al., 2013). Since the discovery of MDR1 27 years ago has been demonstrated that this reaction is not always specific or with high affinity and can transport hydrophobic compound. Human P-gp was initially discovered in cancer cells in KB carcinoma cell line, KB-C2.5 in 1986, selected for its resistance to colchicines (Gros et al., 1986). Nowadays, P-gp is recognized to play a relevant role in pharmacokinetics and pharmacodynamics of many compounds due to its expression and large list of therapeutic substrates (Kharasch et al., 2008; Wilkinson, G. R. 2005). fluorescent dyes (e.g., rhodamine 123) and many therapeutic agents such as HIV protease inhibitors (e.g., ritonavir), antiarrhythmic drugs (e.g., digoxin), steroids (e.g., dexamethasone), antibiotics (e.g., rifampicin, erythromycin), immunosuppressants (e.g., cyclosporin A), anticancer drugs (e.g., vinblastine, doxorubicin, etoposide), among others (Pal et al., 2011; Boffito M 2002). P-gp, an ABC1 gene product, is expressed in various tissues and organs in humans, in the small and large intestinal epithelium, capillary endothelial cells of the brain, placenta, kidney, liver, capillary endothelial cells of the testes and pancreas. P-gp also plays relevant roles in the excretion of xenobiotics through canalicular membrane of the hepatocytes into bile, the brush-border membrane of the enterocytes in the duodenum and proximal tubules into urine (Marchetti et al., 2007). Therefore, P-gp likely is involved in a defense mechanism against harmful substances. Study of P-gp expression in human healthy Caucasian male lymphocytes showed high correlation between P-gp expression and aging (Vilas-Boas et al., 2011). The aim of this study was to evaluate the P-gp expression and efflux activity using whole blood from MDR-TB patients under treatment by flow cytometry enabling comparisons both analysis in lymphocytes, monocytes and granulocytes under high pressure of drugs. Due to treatment in MR-TB with multiple drugs and infection with *M. tuberculosis* that can increase P-gp expression (Gollapudi S, et al 1994), this study is a contribution for understanding of the pharmacogenetic during MDR-TB through MDR1 expression and their activity.

Materials and Methods

Materials

Rhodamine 123 (R8804), PBS buffer and cyclosporine A obtained from Sigma-Aldrich (St.Louis, MO). Monoclonal antibody anti- CD3 (clone UCTH1), anti-CD4 (clone M5E2) Biologend San Diego CA., anti-CD8 (clone SFIC21ThysD3), CD14 and CD243 (clone UIC2) obtained from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA). Lysis solution was from Excellyse easy was from Exbio (Vestec, Czech Republic).

Blood Samples

One blood samples were collected from patients under MDR-TB treatment. Documented by performing mycobacterial culture and under TBMR treatment according to the criteria established by the Guide to Epidemiological Surveillance (Brazilian Ministry of Health 2011) (Table 1). All patients voluntarily sign the term of free and informed consent before joining the study and after a detailed explanation of the nature of the study. In case of the inability of the patient's legal representative may sign instead. Regarding demography data 50% for each gender was included, the total of the white and non white was 38,5% and 61,5% respectively and the volunteers had mean = 42,15 (SD=18, 9) years old. The patients involved in this study were separated in two group one to six months treatment and other with more than six months treatment and comparing the profile of P-gp expression and activity in monocytes because of the relationship these cells with tuberculosis. Besides, The patients were divided more two groups, taking into consideration the date of blood collection: one group treated with 3 drugs and the other group with more than 3 drugs.

Determination of P-gp expression by Flow Cytometry

The determination of the expression of P-gp was accomplished through the use of monoclonal antibody anti-P-gp labeled (CD243 clone UIC2). The antibodies to CD14, CD3, CD4, CD8, CD45 were used for monocytes and lymphocytes label. The tests will be carried out following the manufacturer's determinations using 100uL of peripheral blood. The lysed RBCs are removed through lysis solution Excellyse easy. To control nonspecific markings are used in the same isotype nonspecific immunoglobulin labeled with the same fluorochrome. Detection of binding antibodies and cells will be performed by flow cytometry XL-MCL Beckman Coulter laser 488nm for excitation of fluorochromes. The analysis was conducted with a flow cytometric protocol in which size forward scatter (FSC) and granularity side scatter (SSC) and 530nm fluorescence emission (FL1) were measured for Rho123 and other fluorochromes with Dot plot in the surface marker analysis.

Whole Blood White Cells Stain for Efflux activity determination (Pg-P function)

All parameter were standardized previously, including Pg-P inhibition selection and accumulation and efflux time. For detection of Pg-P transporter activity Rho 123 (Sigma, Taufkirchen, Germany) was used for fluorescence determination as Consensus recommendations (Beck WT et al., 1996). CsA was used as inhibitor of Pg-P activity. A total 100ul of whole blood was incubated with Rho 123 (5ug/mL) for 30 minutes at 37°C, with and without CsA for accumulation, then accumulation with Rho 123 the aliquots were washed twice with buffer solution (PBS) and resuspend with and without CsA in PBS with 5% fetal bovine serum (FBS) no addition of the Rho 123 for 90 minutes at 37°C for efflux. After this the red cells were lysis as described above and fluorescence was detected by flow cytometry. The ratio mean fluorescence (RMF) was calculated of mean fluorescence Rho123 without CSA divided by mean fluorescence with CSA. As the amount of intracellular Rho123 stains content after CSA addition correlated with P-glycoprotein activity, RMF <1 was considered positive, Figure 1.

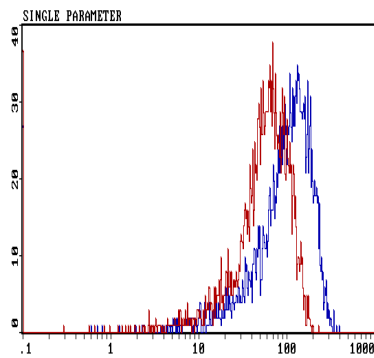


Figure 1 – Representative histogram of Rho123 fluorescence after 90 minutes without CSA (red line) and with CSA addition (Blue line), indicating CSA efflux inhibition.

Statistical Analysis

Pearson Non parametric correlation test was used. The independent *T test* was used to compare means between variables. The significance level was fixed at 0,05. Statistical analysis was performed by SPSS (PASWStatistics20.0).

Results

Whole Blood White Cells Stain with Rho123

The use of whole blood, allowed the incorporation of Rho 123 determination between the three populations of white cells (lymphocytes, monocytes and granulocytes respectively), as expected due to cell morphology there was differences in fluorescence intensity. Representative histograms of the Rho 123 stain, **Fig-02**.

Efflux Activity between populations

Since the cells were stained with Rhod123, perform an efflux activity determination by inhibition through CSA related directly to P-GP interaction was made. There was a high correlation between lymphocytes and monocytes (Pearson $p < .01$). Monocytes and granulocytes there was good correlation (Pearson $p < .05$), but no correlation between lymphocytes and granulocytes (Pearson $p = .063$). The graphs represent the efflux activity determination evidenced by efflux inhibition through CSA and correlations between the cells . lymphocytes versus monocytes from patients, **Fig-03**.

CD243 expression in the populations

Normally monocytes and Granulocytes haven't expression of the P-gp in healthy individuals, but this study revealed this expression in both cells from TBMR patients, **Table -02**. The determination of the expression of P-gp with the use of monoclonal antibody anti-P-gp labeled (CD243 clone UIC2) as represented by **Fig-4**.

P-gP expression and their activity and patient's characteristics

The variables race, gender ,age and their association with P-gp expression and their activity were analyzed . There was only a significant correlation between P-gp expression in monocytes and age (Pearson $p < 0.01$) as observed on **Fig-05**. No correlation was found with race or gender. Regarding the influence of race / color on P-gp expressions a difference was observed in lymphocytes in white patients than not white patients although without statistical significance, **Fig-06**.

Relationship of Expression and activity of P-gp in Monocytes and treatment time.

Regarding the duration of treatment of MDR-TB a highest P-gp expression in lymphocytes was highest in individuals in the first 6 months of treatment ($P < .01$). However, P-gp expression was highest in monocytes and granulocytes in individuals with over 6 months of treatment. Besides, individuals up to 6 months of treatment showed a higher efflux activity than those with more than 6 months, **Fig-07**.

Discussion

Tuberculosis (TB) remains a major global health problem (WHO, 2010). Depending on the type of B, its treatment can last for 6-24 months which is a major cause for patient's non-compliance and treatment failure. Globally, 3.7% of new cases and 20% of previously treated cases are estimated to have multidrug-resistant tuberculosis (Shao Y. 2011). P-gp is constitutively present in a number of normal tissues such as intestine, brain, liver, kidney, endothelial cells in the blood-brain barrier and the choroid plexus express high levels of P-gp and multidrug treatment can affect all organism (Gottesman and Pastan, 1993; Ambudkar et al., 1999). The P-gp expression and activity determination with whole blood by flow cytometry, showed in this study, represent an import approach for clinical use within a routine due be easy and fast perform. Allow choice an analysis in mononuclear cells (lymphocytes and monocytes) and granulocytes allowing establishment a monitoring during treatment and may be an import tool to prevent the side adverse or treatment failed mainly in multidrug regimen as observed on MRTB (**Table 2**). The age as observed for us, correlated with monocytes P-gp expression but without correlation with increase of the activity, same phenomenon observed for Vilas-Boas et al, 2011 with a group of the Caucasian health men that showed itself in lymphocytes. Interesting that all patients enrolled in this study were treated with Rifampicin (RIP) on first treatment phase and RIP is an inducer of the P-gp in lymphocytes (Hall D. et al, 2009; Finch CK et al., 2002) but our results and other studies don't found association between this expression and efflux activity in lymphocytes. Our study revealed a correlation between the P-gp expression in monocytes and aging (*Pearson, P < .01*) and this result was unexpected because monocytes do not express P-gp in healthy individuals that express only *MDR1* mRNA (Drach D. et al., 1992; Chaudhary PM et al., 1992). There is evidence of genetic differentiation among the races and the importance of the race and ethnic background in biomedical and clinical practice have been considered (Burchard G.E. Et al., 2003; Weiner, M et al 2010). Genetic polymorphism in P-gp has been demonstrated between individuals of different ethnic background. More than 90% of Japanese, 60% of European American and 80% of Caucasian German have both 2677G>T and 3435C>T SNPs, showed an allelic frequency distribution of SNPs is reported to be highly racially dependent (Ieiri Ichiro, 2012; Schaeffeler E 2001). Differences between white and nonwhite patients were observed in our study, although no statistical difference was observed, but this result is important because there is great racial miscegenation in Brazil. An increase of P-gp expression on lymphocytes was statistically significant in patients with until

6 months of treatment than patients with above of six months of treatment ($P < .01$). The use of whole blood is already widely used to determine the expression of cell surface molecules in peripheral blood. Therefore, the determination of P-gp expression is very important data, but the incorporation of the Rho 123 and your activity with whole blood, as demonstrated in this study, can open the possibility of monitoring and clinical research on patients under treated with multiple drugs without mononuclear cells separation process necessity. Whole blood process needs low amount of blood and is quick in according to the needs clinical routine in infection diseases or other specialty. Increase of expression of this transporter on lymphocytes, monocytes and granulocytes suggesting that as occur with $CD3^+ / CD4^+$ and $CD3^+ / CD8^+$ quantification for patients seropositive for HIV, can be further used in clinical decisions through $CD3^+ / CD243^+$ quantification in the future for patients MDR-TB, but is necessary identify, beyond RIP, what's drugs used on MDR-TB treatment can change on the P-gp expression and activity.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Solange Alves Cruz and team of Evandro Chagas Clinical Reserch Institute for the collection of blood samples.

BIBLIOGRAFY

Ambudkar, S. V.; Kimchi-Sarfaty, C.; Sauna, Z. E.; Gottesman, M. M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003. 22 (47): 7468-7485.

Beck WT, Grogan TM, Willman CL, Cordon-Cardo C, Parham DM, Kuttesch JF, Andreeff M, Bates SE, Berard CW, Boyett JM, et al. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: Consensus recommendations. *Cancer Res* 1996.56:3010–3020.

Boffito M, Rossati A, Reynolds HE, Hoggard PG, Back DJ, DiPerri G. Undefined duration of opiate withdrawal induced by efavirenz in drug users with HIV infection and undergoing chronic methadone treatment. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002. 18(5):341–2.

Burchard EG, Ziv E, Coyle N, et al. The importance of race and ethnic background in biomedical research and practice. *N Engl J Med* 2003. 348:1170–1175.

Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 1992.80:2735–2739.

Pal, D., Kwatra, D. Minocha, M. et al. Efflux transporters- and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. *Life Sci.* 88(21-22): 959–971, 2011 .

Drach, D., Shourong, Z., Drach, J., Mahadevia, R., Gattringer, C., Huber, H., and Andreeff, M. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. *Blood* 1992. 80: 2729-2734.

Finch CK, Chrisman CR, Baciewicz AM: Rifampin and rifabutin drug interactions: an update. *Arch Intern Med* 2002.162:985-92.

Gollapudi S., Reddy M., Gangadharam P., et al., Mycobacterium Tuberculosis Induces Expression of P-glycoprotein in promonocytic U1 cells Chronically Infected With HIV Type 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1994. 199 (3): 1181-1187.

Hall, R.G., Pharm D., Richard D. Leff, Pharm.D., FCCP, and Tawanda Gumbo, M.D. *Pharmacotherapy*. 2009 December ; 29(12): 1468–1481. doi:10.1592/phco.29.12.1468.

Gros P, Croop J, Housman D. Mammalian multidrug resistance gene: Complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 1986.47:371–380.

Ieiri Ichiro, Functional significance of genetic polymorphism in P- Glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). *Drug. Metab Pharmacokinet*.2012, 27(1): 85-105.

Finch CK, Chrisman CR, Baciewicz AM: Rifampin and rifabutin drug interactions: an update. Arch Intern Med.162:985-92, 2002.

König J. , Müller F., Fromm M. F. Transporters and Drug-Drug Interactions: Important Determinants of Drug Disposition and Effects. Pharmacological Rev 2013. 65:944-966.

Kharasch ED, Bedynek PS, Walker A, Whittington D, Hoffer C. Mechanism of ritonavir changes in methadone pharmacokinetics and pharmacodynamics: II. Ritonavir effects on CYP3A and P- glycoprotein activities. Clin Pharmacol Ther. 2008. 84 (4):506–12.

Marchetti, S., Mazzanti, R., Beijnen, J., Schellens, J. H. M. Concise Review: Clinical Relevance of Drug–Drug and Herb–Drug Interactions Mediated by the ABC Transporter ABCB1(MDR1, P-glycoprotein). The Oncologist 2007 .12:927–941.

Shao Y., Yang D., Xu W. et al. BMC Public Health 2011, 11:110.

Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, Schwab M. Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. Lancet 2001.4;358(9279):383-4.

Vilas-Boas, V., Silva R., Gaio, A. R. et al. P-Glycoprotein Activity in Human Caucasian Male Lymphocytes Does Not Follow its Increased Expression During Aging. Cytometry. Cytometry Part A 2011.79A: 912919.

Weiner, M., Peloquin, C., Burman W., et al., Effects of Tuberculosis, Race, and Human Gene *SLCO1B1* Polymorphisms on Rifampin Concentrations. Antimicrobial Agents And Chemotherapy 2010. 10 (54): 4192–4200.

World Health Organization 2010. The Global Plan to Stop TB 2011-2015. Geneva, Suíça.

Wilkinson, G. R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. N Engl J Med 2005. 352(21): 2211-21.

Zhang L., Strong JM, Qiu W., et al., Scientific Perspectives on Drug Transporters and Their Role in Drug Interactions. Mol. Pharm. 2006. 3 (1), 62-69.

Figures and Tables

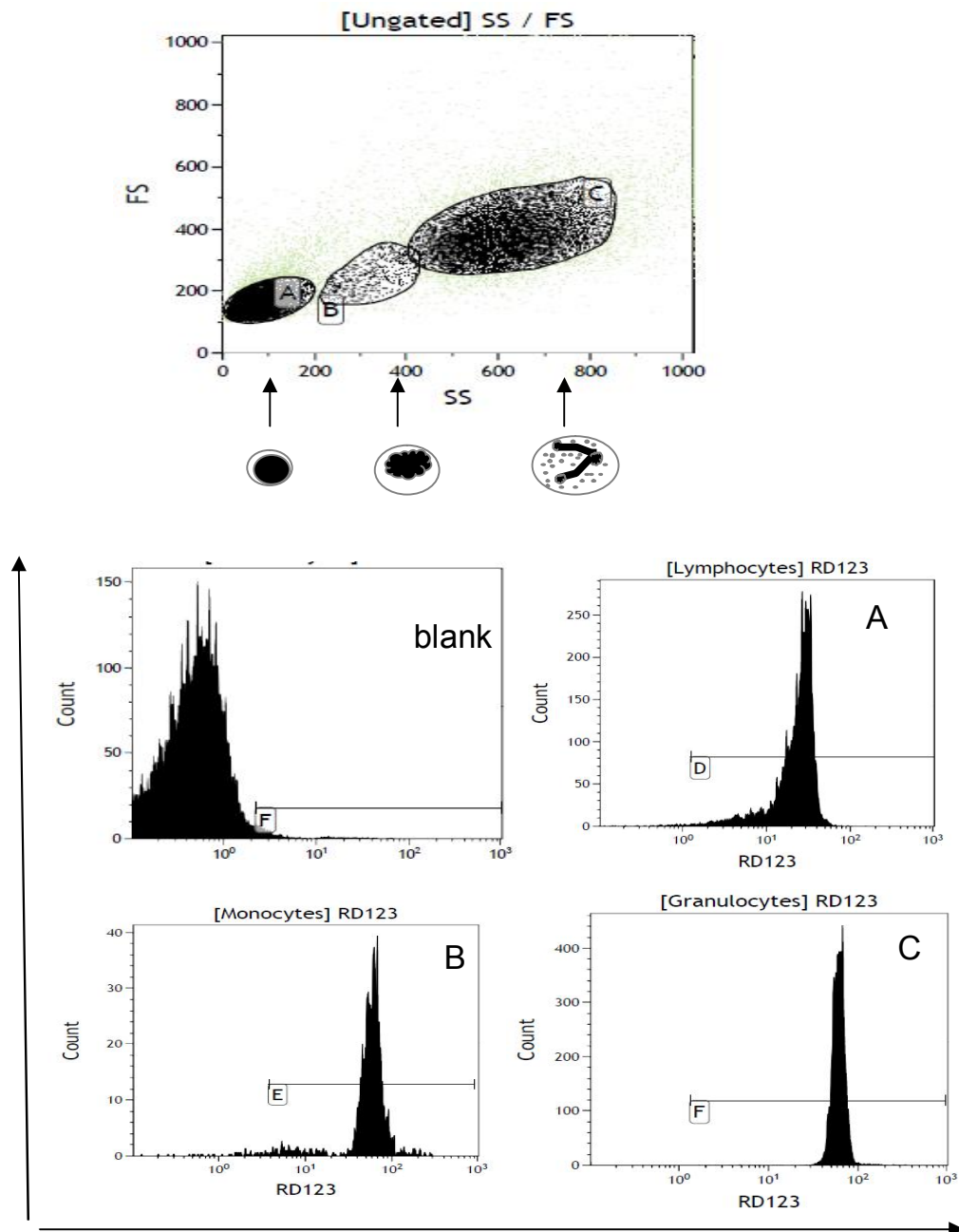


Fig 2 – Control – **Blank** ; Lymphocytes - **A**; Monocytes - **B** and Granulocytes - **C**.

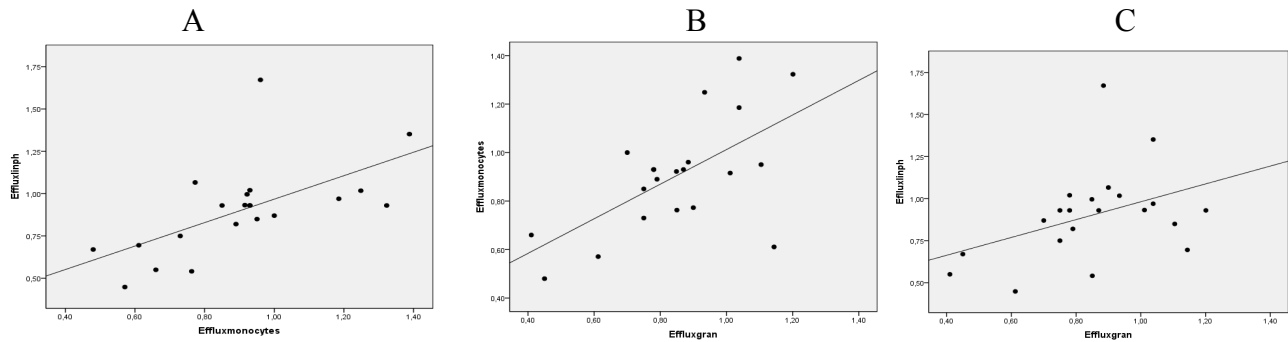


Fig-03 - Lymphocytes versus Monocytes **graph A**. Monocytes versus Granulocytes - **graph B**. Lymphocytes versus Granulocytes - **graph C**.

Table 1: Treatment Regimen for MRTB

Regimen	Drug	Doses for weight				Months
		Up to 20kg	21kg a 35kg	36kg a 50kg	> 50kg	
2SSELZT Intensive Phase	Streptomycin	20mg/kg/day	500mg/day	750mg/day - 1000mg/day	1000mg/day	2
	Ethambutol	25mg/kg/day	400mg/day - 800mg/day	800mg/day - 1200mg	1200mg/day	
	Levofloxacin	10mg/kg/day	250mg/day - 500mg/day	500mg/day - 750mg/day	750mg/day	
	pyrazinamide	35mg/kg/day	1000mg/day	1500mg/day	1500mg/day	
	Terizidone	20mg/kg/day	500mg/day	750mg/day	750mg/day - 1000mg/day	
4S3ELZT Intensive Phase 2 ^a step	Streptomycin	20mg/kg/day	500mg/day	750mg/day - 1000mg/day	1000mg/day	4
	Ethambutol	25mg/kg/day	400mg/day - 800mg/day	800mg/day - 1200mg	1200mg/day	
	Levofloxacin	10mg/kg/day	250mg/day - 500mg/day	500mg/day - 750mg/day	750mg/day	
	Pyrazinamide	35mg/kg/day	1000mg/day	1500mg/day	1500mg/day	
	Terizidone	20mg/kg/day	500mg/day	750mg/day	750mg/day - 1000mg/day	
12 ELT Maintenance Phase	Ethambutol	25mg/kg/day	400mg/day - 800mg/day	800mg/day - 1200mg/day	1200mg/day	12
	Levofloxacin	10mg/kg/day	250mg/day - 500mg/day	500mg/day - 750mg/day	750mg/day	
	Terizidone	20mg/kg/day	500mg/day	750mg/day	750mg/day - 1000mg/day	

Obs: All study patients were previously treated for 6 months with rifampicin (R), isoniazid (H), pyrazinamide (Z) and Ethambutol (E) according to the Manual of the Ministry of Health, Brazil before multiresistance treatment listed in this table.

	CD4 ⁺ /P-gp ⁺	CD8 ⁺ /P-gp ⁺	CD3 ⁺ /P-gp ⁺	Mono/P-gp ⁺	Gran/P-gp ⁺
N	26	26	26	26	26
Mean	4,04%	7,9%	10,4%	21,9%	26,2%
S.E.	1,54	1,64	2,02	4,91	4,56
Median	1,78	3,60	4,51	8,50	17,30

Table 2 - Expression of the P-gp in lymphocytes (CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺ or CD3⁺/CD8⁺), monocytes and granulocytes by flow cytometry.

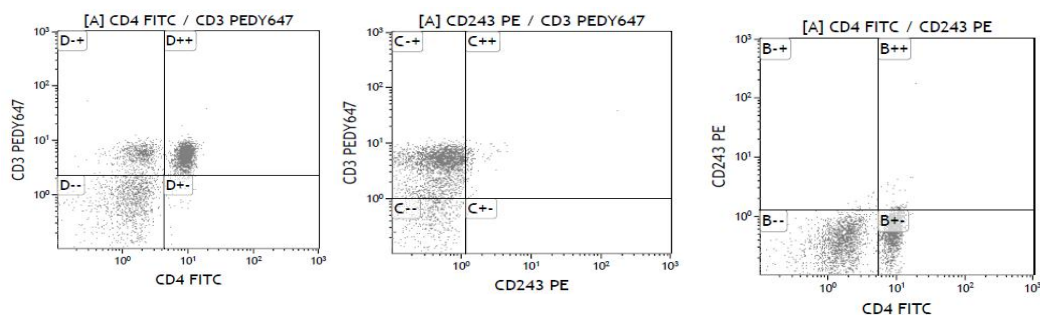


Fig 4 – Dot plot Representative of P-gp determination in lymphocytes CD3⁺/CD4⁺/CD243⁺ by flow cytometry following the consensus for cellular glycoprotein-P immunophenotyping, using monoclonal antibody anti-P-gp labeled (CD243 clone UIC2).

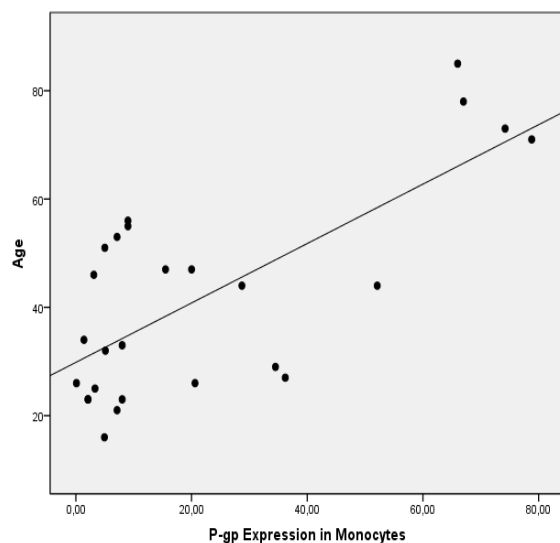


Fig 5 - The study revealed a correlation between the P-gp expression in monocytes and aging (*Pearson*, $P < .01$). An increase was observed on P-gp expression on oldest MDR-TB patients.

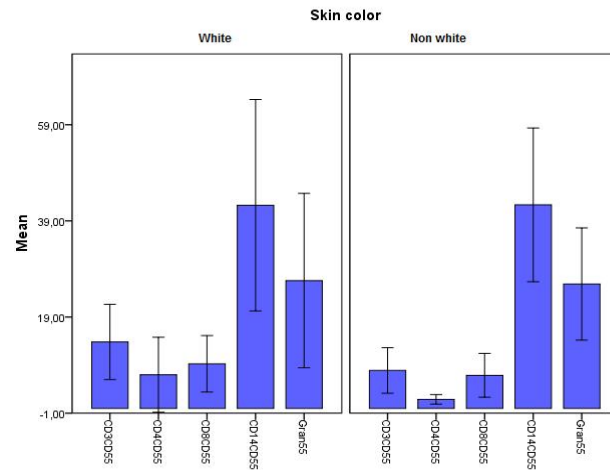


Fig.6 - Analysis of Expression of P-gp efflux based on race revealed a increased on lymphocytes CD3⁺ and CD3⁺/CD4 on white patients than non white patients, but whitouth statistic differences.

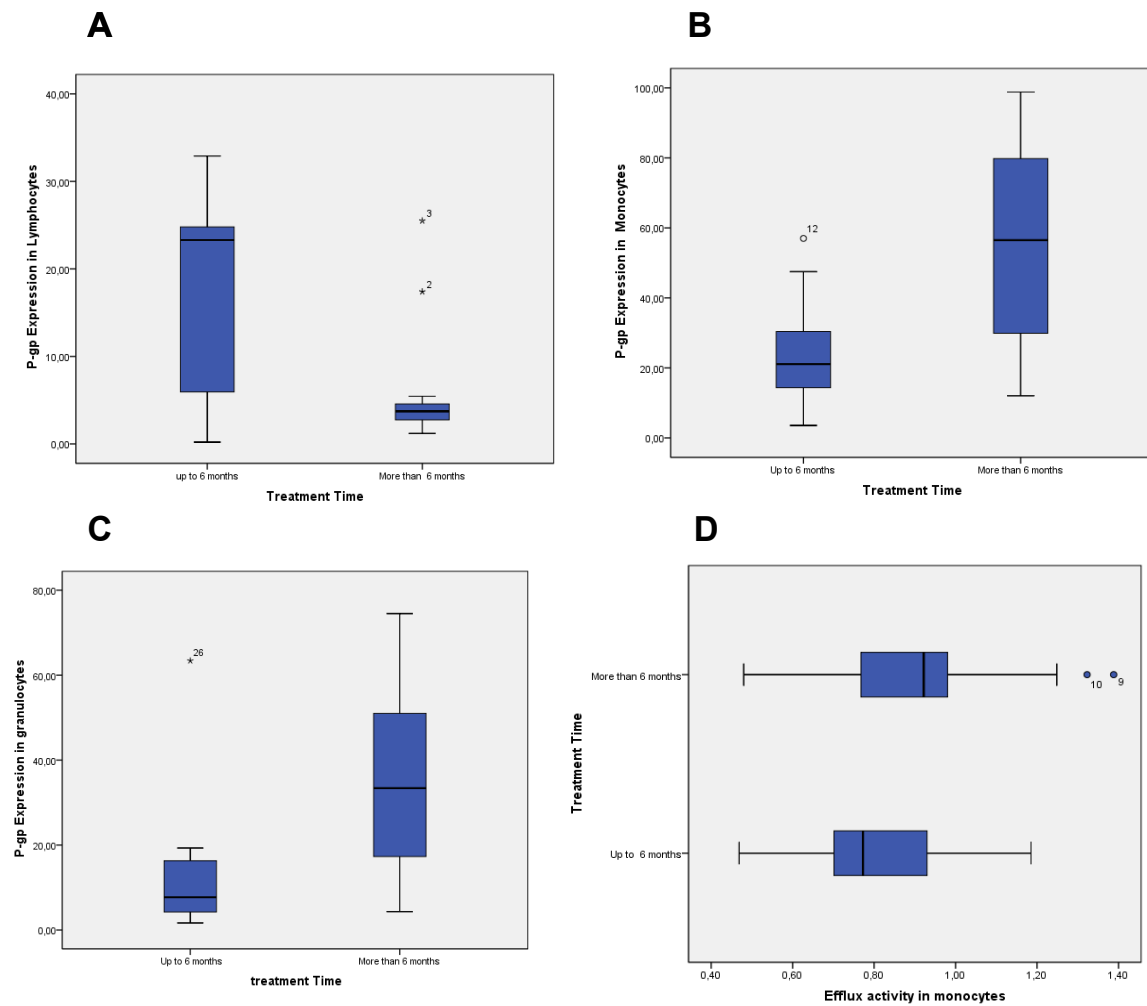


Fig.7 - P-gp expression in lymphocytes (A); The P-gp expression in monocytes (B) and granulocytes (C). Efflux activity in monocytes (D).

