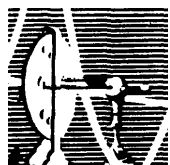


***Clarissa Rodrigues Nascimento***

**EFEITO CITOTÓXICO E MODULADOR DA  
CICLOSPORINA A NAS LINHAGENS RENAIIS  
LLC-PK1, MDCK E Ma104.**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO  
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Fisiologia Renal do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, e no laboratório de Imunologia Tumoral do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ. O trabalho foi orientado pela Dra. Márcia Alves Marques Capella.

# FICHA CATALOGRÁFICA

Nascimento, Clarissa Rodrigues

Efeito citotóxico e modulador da Ciclosporina A nas linhagens renais LLC-PK1, MDCK e Ma104 / Clarissa Rodrigues Nascimento. Rio de Janeiro: UFRJ/Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2005.

xv, 101p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2005.

Orientador: Márcia Alves Marques Capella.

1) Ciclosporina A. 2) Rodamina 123. 3) Pgp. 4) LLC-PK1. 5) Ma104. 6) MDCK.

Dedico este trabalho a minha avó paterna em memória.  
Ela colocou emoções fortes em cada gota de tinta, quem olhar  
suas telas sentirá cada gota de emoção sem tirar de lá.

## AGRADECIMENTOS

Parte interessante de uma tese. Na realidade, “agradecimentos” não é uma parte da minha tese, mas parte do meu curso de mestrado, dos meus dias, das minhas horas, dos meus minutos, nunca o suficiente para tudo ao mesmo tempo. Se o tempo (noção tão estranha) tem um limite, existe uma só maneira que eu conheço de alterar o tempo ...

... tendo por “perto” as pessoas que tornam possíveis as coisas mais difíceis e que merecem tudo de bom, mais AGRADECIMENTOS.

Aos meus pais, meu namorado e minha família por serem os melhores pai e mãe, melhor namorado e melhor família.

À Márcia Capella, minha orientadora, que confiou nos meus gestos exagerados e na minha enorme dificuldade de apresentar prévia. Por estar sempre presente, sempre cuidadosa com a orientação. E principalmente por ter me dado a mais importante liberdade que podia me dar; a liberdade de aprender.

Ao professor Anibal Gil Lopes, pela oportunidade de saber um pouco sobre os alunos de graduação de medicina nas tutorias. Por tantas conversas, todas importantes e nos melhores momentos. E principalmente por ter me ensinado, de uma forma que não me deixa esquecer, que Doutorado é formação de conhecimento novo, e não pode ser nada menos que isto.

À Vívian Rumjanek, por toda a ajuda. Por ensinar sobre um olhar que poucos têm, por ensinar sobre uma Ciência que poucos fazem.

À Dra. Ottilia por ser tudo que ela é. Por todas as conversas, por ser otimista e altruísta. Por ser linda e por uma incrível capacidade de mudar meu humor para muito melhor.

À professora Cerli por este início de convivência.

Ao Luiz Capella pela ajuda com o microscópio, e por sempre saber a parte Física das coisas.

Ao Shan por resolver tão bem as piores coisas do laboratório.

À Jack, André e Sebastião por trabalharem bem para que tudo funcione bem.

Ao Raphael que elevou a ouabaína ao *status* de hormônio, mas que mesmo assim não conseguiu fama suficiente para andar no último grito da moda, e agora vai tentar elevar receptores *toll-like* ao *status* de hormônio.

Ao Filipe que é um grande amigo, que esteve comigo agüentando as melhores e piores horas. Uma pessoa que não tem medo de mudanças, de ousar, e que neste ponto se parece muito comigo. Mas em outro ponto é muito diferente: faz economia de emoção - mas não é qualquer emoção é emoção de resultado de experimento. Uma pessoa muito boa com aqueles que precisam dele, coisa que eu admiro muito.

Ao Flávio que é capaz de se esquecer de muitas coisas, mas não se esquece de ser carinhoso com as pessoas.

Ao Paulo que sempre me ajudou (por livre e espontânea pressão) em tudo o que eu precisei, principalmente na maravilhosa tarefa de buscar litros e mais litros de água destilada.

À Juliana amiga de várias notas, mas que no final sempre recupera. Amiga de todas as horas, de todos os crepes. Às vezes teimosa para entender quando é preciso gastar dinheiro para comprar o número certo. Uma ótima companhia para todas as conversas, desde a região ideal para um histograma até a região ideal para se furar a orelha.

À Clarice que sempre topa fugir um pouquinho, que sempre me ajudou nos gráficos da vida. Uma amiga que tem sempre boas histórias para contar, que eu adoro muito e de quem não vou querer perder as próximas histórias. Eu, que tenho que fazer força para usar o *email*, sou capaz até de instalar algo como o *msn* para falar com ela à distância.

À Daniela que tem a cara-de-pau de errar o meu nome, mas mesmo assim eu acerto o dela. Uma amiga com quem eu me entendo muito bem, e que está sempre me incentivando nas coisas do trabalho.

À Renata que se mostrou uma boa nova amiga. Desde o dia que mentiu para mim sobre a fama de um professor de uma banca só para me tranquilizar. Tirando as horas que ela está pisando no meu pé ela é ótima.

À Fernanda que é a pessoa mais divertida ao natural que eu conheço, por ter feito para mim uma festa de aniversário inesquecível. Por ser uma companhia de viagem (principalmente viagem louca) surpreendente.

À Virgínia que teve grande culpa na hora de encontrar o laboratório de Imunologia Tumoral. Há anos atrás quando procuramos um estágio ela insistiu muito que queria bioquímica, corta para a cena, nós batemos na porta da escada do corredor da bioquímica achando que era um único laboratório.

À Graça que é sempre gentil, tão dedicada a um trabalho tão bonito.

À Karen por seu bom humor diário.

À Claudia pelas caronas para o Inglês que finalmente acabou. Por ter me deixado colocar a mão na massa, literalmente.

À Alcira por momentos ótimos em horas que teoricamente seriam chatas. Por ser tão criativa e ensinar tão bem.

À Mabel e à Sandra por momentos tão divertidos nos intervalos dos experimentos.

A todos do laboratório de Fisiologia Renal.

A todos do laboratório de Imunologia Tumoral.

A todos os outros laboratórios que sempre emprestam tudo aquilo que podem emprestar, e o que não podem também.



## **PENSAMENTOS**

**Ora (dizeis) ouvir estrelas!**

**“Ora (dizeis) ouvir estrelas!**

**Certo perdeste o senso!**

**E eu vos direi, no entanto,**

**Que, para ouvi-las, muita vez desperto**

**E abro as janelas, pálido de espanto ...**

**E conversamos toda a noite, enquanto**

**A via Láctea, como um pálio aberto, cintila.**

**E, ao vir do sol, saudoso e em pranto,**

**Inda as procuro pelo céu deserto.**

**Dizeis agora: Treloucado amigo!**

**Que conversas com elas? Que sentido**

**Tem o que dizem, quando estão contigo?**

**E eu vos direi: Amai para entendê-las!**

**Pois só quem ama pode ter ouvido**

**Capaz de ouvir e entender estrelas.”**

**Olavo Bilac**

## RESUMO

A Ciclosporina A (CSA), uma droga imunossupressora, é conhecida por inibir a atividade da glicoproteína-P (Pgp ou ABCB1). Apesar disto, a relação entre esta inibição e a nefrotoxicidade induzida pela CSA não foi estabelecida. Neste estudo utilizamos três linhagens epiteliais renais com o objetivo de investigar os efeitos citotóxicos e moduladores da CSA: LLC-PK1 (baixos níveis de expressão de Pgp), MDCK (níveis médios), e Ma104 (altos níveis de expressão). Como resultados temos que após o tratamento com CSA, a viabilidade das três linhagens foi reduzida apenas para concentrações acima de 10  $\mu$ M; a linhagem Ma104 foi a mais resistente e a LLC-PK1 foi a mais sensível. Em concentrações não tóxicas a CSA aumentou o acúmulo de Rodamina 123 (Ro-123, um substrato da Pgp), principalmente nas linhagens MDCK e Ma104. Entretanto, quando a incubação com CSA foi realizada em diferentes momentos em relação à incubação com Ro-123, antes (pré-incubação), durante (co-incubação), e depois (pós-incubação), algumas diferenças foram observadas. Para a Ma104, a pré-incubação não teve efeito modulador. Para a LLC-PK1 e a MDCK, os três tempos de incubação foram eficazes. Nossos resultados sugerem que os efeitos tóxicos da CSA podem ser divididos em: efeito citotóxico direto (independente de Pgp), e efeito indireto (dependente de Pgp), relacionado à modulação da atividade desta proteína. Este último poderia resultar no acúmulo aumentado de substratos potencialmente tóxicos da Pgp, contribuindo para a nefrotoxicidade induzida pela CSA. Além disto, os mecanismos pelos quais a CSA modula a atividade da Pgp podem ser diferentes para diferentes células.

## ABSTRACT

Although Cyclosporin A (CSA) inhibits P-glycoprotein (Pgp or ABCB1), the relationship between this inhibition and CSA-induced nephrotoxicity is not established. In the present study we used three renal cell lines to investigate the effects of CSA in cellular viability and accumulation of Rhodamine 123 (Rho123, a Pgp substrate): LLC-PK1, which does not express Pgp substantially; MDCK, expressing moderate amounts of this protein, and Ma104 cells, which express high amounts of Pgp. We could observe that the viability was significantly reduced in the three cell lines after treatment only with CSA concentrations  $> 10 \mu\text{M}$ . Ma104 was the more resistant and LLC-PK1 the more sensitive. Non-toxic concentrations of CSA increased Rho 123 accumulation in the three cell lines when incubated simultaneously, MDCK presenting the higher increase. However, different results were achieved when the periods of incubation with Rho123 and CSA were disconnected: a post-incubation with CSA was more effective in Ma104 cells, while MDCK and LLC-PK1 showed no difference among pre, co and post incubation with CSA. Our results suggest that the effects of CSA may be divided into two groups: Pgp-independent (direct injury), and Pgp-dependent toxicity, due to modulation of its activity. This could result in increased accumulation of noxious Pgp substrates, contributing to CSA-induced nephrotoxicity. Furthermore, the mechanisms of Pgp modulation by CSA may be different for different cell lines.

# LISTA DE FIGURAS

## Ilustrações

Figura 1 - fórmula estrutural da CSA (página 4).

Figura 2 - desenho esquemático da Pgp na membrana (página 10).

Figura 3 - desenho esquemático dos modelos “modelo da bomba” e “modelo flipase” (página 12).

Figura 4 - desenho esquemático de um rim com detalhe para a estrutura do néfron (página 15).

Figura 5 - desenho esquemático de uma célula renal (de túbulo proximal) (página 16).

## Resultados

Figura 6 - efluxo de Rodamina 123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104 (página 31).

Figura 7 - acúmulo máximo de Rodamina 123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104 (página 34).

Figura 8 - massa mitocondrial das linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104 (página 37).

Figura 9 - acúmulo e localização do corante MTG (página 39).

Figura 10 - efeito da Ciclosporina A sobre a viabilidade celular das linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104 (página 41).

Figura 11 - efeito da Ciclosporina A no efluxo de Rodamina 123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104 (página 44).

Figura 12 - efeito da Ciclosporina A no acúmulo e localização de Rodamina 123, nas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104 (página 47).

Figura 13 - efeito da Ciclosporina A, em diferentes momentos de incubação, no efluxo de Rodamina 123 pela linhagem LLC-PK1 (página 50).

Figura 14 - efeito da Ciclosporina A, em diferentes momentos de incubação, no efluxo de Rodamina 123 pela linhagem MDCK (página 52).

Figura 15 - efeito da Ciclosporina A, em diferentes momentos de incubação, no efluxo de Rodamina 123 pela linhagem Ma104 (página 54).

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CSA	Ciclosporina A
CYP3A4	enzima citocromo P450 3A4
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
LLC-PK1	Linhagem epitelial renal (origem – túbulo proximal - rim de porco)
Ma104 Rhesus)	Linhagem epitelial renal (origem – rim de embrião de macaco
MDCK de cão)	<i>Madin-Darby canine kidney</i> – linhagem epitelial renal (origem - rim
MDR	Resistência a múltiplas drogas ( <i>multidrug resistance</i> )
<i>MDR1</i>	Gene que codifica a glicoproteína-P em humanos
<i>mdr1a</i>	Gene a que codifica a glicoproteína-P em camundongos
<i>mdr1b</i>	Gene b que codifica a glicoproteína-P em camundongos
<i>mrp</i> drogas 1	Gene que codifica a proteína associada à resistência a múltiplas
MRP1	Proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas 1
MTG	<i>MitoTracker Green FM</i> – traçador verde mitocondrial
MTT	[Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol]
NF-AT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
OAT	Transportador de ânions orgânicos ( <i>organic anion transport</i> )
OCT	Transportador de cátions orgânicos ( <i>organic cation transport</i> )
PBS	Solução salina tamponada ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
Pgp	Glicoproteína-P ( <i>P-glycoprotein</i> )
Ro-123	Rodamina 123
SFB	Soro fetal bovino
VP	Verapamil

# SUMÁRIO

<b>FICHA CATALOGRÁFICA.....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>PENSAMENTOS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<i>1.1– A Ciclosporina A: história e descoberta.....</i>	<i>2</i>
<i>1.2 – Características da Ciclosporina A.....</i>	<i>4</i>
<i>1.3 – A nefrotoxicidade associada a Ciclosporina A.....</i>	<i>5</i>
<i>1.4 – A Ciclosporina A e a reversão da resistência a múltiplas drogas.....</i>	<i>7</i>
<i>1.5 – O fenótipo de resistência a múltiplas drogas.....</i>	<i>7</i>
1.5.1 – A glicoproteína-P.....	9
1.5.1.1 – A glicoproteína-P em células normais.....	13
1.5.1.2 – A glicoproteína-P e o sistema renal de secreção tubular.....	13
1.5.2 – A proteína associada à resistência a múltiplas drogas 1.....	17
<b>2. Justificativa e Objetivo.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>22</b>
3.1 – <i>Material.....</i>	<i>23</i>
3.1.1 - Soluções e Reagentes.....	23
3.1.2 – Células.....	24
3.2 – <i>Métodos.....</i>	<i>25</i>
3.2.1 - Condições de cultura.....	25
3.2.2 – Avaliação da viabilidade celular.....	25
3.2.3 – Avaliação do acúmulo intracelular de Rodamina 123.....	26
3.2.4 - Avaliação da massa mitocondrial.....	28
3.2.5 - Microscopia de fluorescência.....	29
3.2.6 – Análise estatística.....	30
<b>4. Resultados.....</b>	<b>31</b>

<i>4.1 - Efluxo de Rodamina 123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104.....</i>	<i>32</i>
<i>4.2 – Acúmulo máximo de Rodamina 123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104.....</i>	<i>35</i>
<i>4.3 – Massa mitocondrial das linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104.....</i>	<i>38</i>
<i>4.4 – Visualização do acúmulo e localização do corante MTG.....</i>	<i>40</i>
<i>4.5 - Efeito da Ciclosporina A sobre a viabilidade celular das linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104.....</i>	<i>45</i>
<i>4.6 - Efeito da Ciclosporina A no efluxo de Rodamina 123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104.....</i>	<i>48</i>
<i>4.7 - Efeito da Ciclosporina A no acúmulo e localização de Rodamina 123, nas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104.....</i>	<i>52</i>
<i>4.8 - Efeito da Ciclosporina A, em diferentes momentos de incubação, no efluxo de Ro-123 pela linhagem LLC-PK1.....</i>	<i>54</i>
<i>4.9 - Efeito da Ciclosporina A, em diferentes momentos de incubação, no efluxo de Ro-123 pela linhagem MDCK.....</i>	<i>56</i>
<i>4.10 - Efeito da Ciclosporina A, em diferentes momentos de incubação, no efluxo de Ro-123 pela linhagem Ma104.....</i>	<i>58</i>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>60</b>
<i>5.1 – As linhagens LLC-PK1, MDCK, Ma104 e a atividade funcional da glicoproteína-P.....</i>	<i>61</i>
<i>5.2 – O efeito citotóxico da Ciclosporina A.....</i>	<i>62</i>
<i>5.3 – O efeito modulador da Ciclosporina A.....</i>	<i>65</i>
<i>5.4 – Considerações finais.....</i>	<i>68</i>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>71</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>73</b>
<i>7.1 – Referências bibliográficas de documentos em meio eletrônico.....</i>	<i>84</i>
<b>ANEXO: ARTIGO PUBLICADO.....</b>	<b>85</b>





# ***1. Introdução***

---

## 1.1 – A Ciclosporina A: história e descoberta

Por volta de 1957 foi estabelecido um programa (nos laboratórios Sandoz, Basel, Suíça) voltado para a busca de substâncias derivadas de fungos que apresentassem efeitos característicos de antibióticos (citado em HEUSLER & PLETSCBER, 2001). Neste programa, em 1970, a partir de duas amostras de solo de origens distintas, foi identificado o fungo *Tolipocladium inflatum*, que apareceu como novo no banco de dados do programa. Uma primeira análise revelou que se tratava de um fungo que produzia um complexo de metabólitos interessante que apresentava efeito antifúngico. Após uma série de purificações e testes, resultados mais avançados revelaram apenas um estreito espectro de atividade antifúngica, apenas algumas espécies de fungos se apresentaram sensíveis aos metabólitos. Além disto, nenhuma atividade antibacteriana foi verificada. Com base na análise minuciosa da posição taxonômica das espécies sensíveis, foi desenvolvida uma hipótese de que o efeito observado seria via inibição da síntese de parede celular, o que seria de grande interesse, pois esta via era compatível com alta especificidade e baixa toxicidade a hospedeiros. Mas, como os metabólitos não apresentaram efeitos que indicassem ação sobre a síntese de parede celular, neste ponto as investigações foram interrompidas (DREYFUSS *et al.*, 1976).

O referido programa, no mesmo período, integrou novos laboratórios cujos interesses incluíam a busca por um agente imunossupressor que não apresentasse toxicidade. Para este fim foi desenvolvido um método que possibilitava medir, em camundongos, imunossupressão, por um teste de

hemaglutinina, e atividade citostática, por inibição do crescimento de tumores, através de injeção intraperitoneal da substância a ser testada. A mistura de metabólitos do fungo *Tolipocladium inflatum* foi então enviada a estes grupos, e os testes foram realizados. Foi observado, nos experimentos iniciais, uma atividade imunossupressora na ausência de atividade citostática (BOREL *et al.*, 1976).

Experimentos posteriores demonstraram uma inibição da proliferação de linfócitos, mas que parecia não afetar outras células. Esta descoberta coincidia com testes fracassados do potencial agente imunossupressor Ovalacina, em decorrência de fortes efeitos tóxicos (BOREL *et al.*, 1977). Por conseguinte, crescia o interesse em torno da substância ativa na mistura de metabólitos do fungo *T. inflatum*.

A substância ativa foi encontrada e denominada Ciclosporina (por Jean-François Borel). Este nome vem da característica cíclica da molécula, e do fato dos autores terem acreditado que esta substância fazia parte de uma família de defensinas que formavam poros (citado em BOREL & KIS, 1991).

Após intensa pesquisa com a substância isolada, em 1983, a Ciclosporina foi aprovada pela *Food and Drug Administration* para o uso como agente imunossupressor a ser utilizado em transplantes. Este fato teve um grande impacto. Entre outras coisas, transplantes que ainda estavam em fase de experimentação, como por exemplo, o de coração, e por isto representavam apenas uma esperança de cura, passaram a ser realidade para muitos pacientes.

## 1.2 – Características da Ciclosporina A

Atualmente, já se sabe que a Ciclosporina A (CSA) é um polipeptídeo cíclico de 11 aminoácidos (figura 1), altamente lipofílico (BOREL & HIS, 1991).

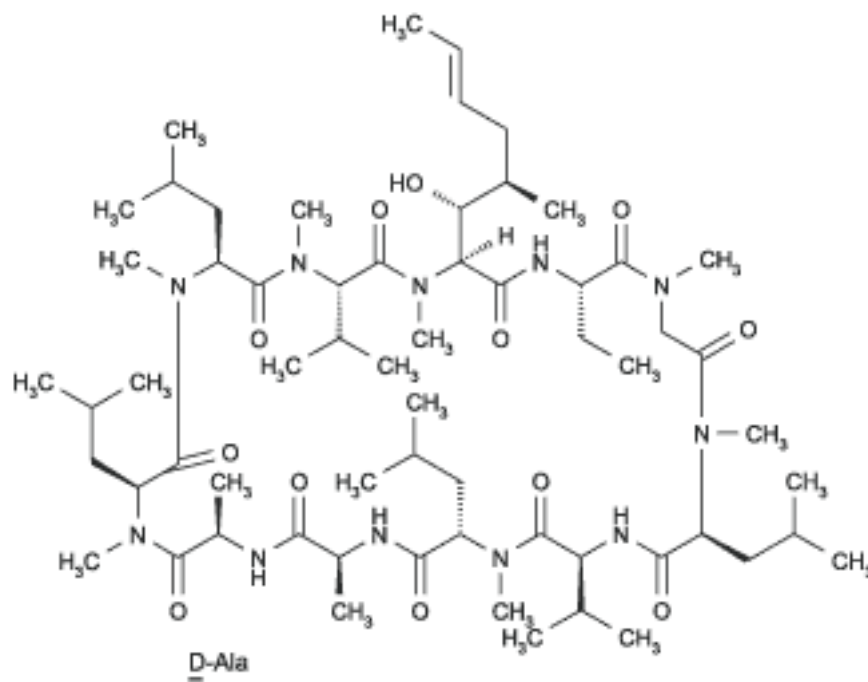


Figura 1. Fórmula estrutural da CSA.

A CSA, quando administrada ao paciente, tem larga distribuição, principalmente no sangue, plasma e tecidos ricos em lipídeos. No sangue se liga a eritrócitos. No plasma se liga às lipoproteínas de alta e baixa densidade (HDL e LDL, respectivamente), e com menor frequência à albumina. Na clínica, vêm sendo relatadas variações intraindividuais e interindividuais no efeito da CSA, o que deve estar relacionado com a característica de ligação a proteínas

plasmáticas. Isto justifica, portanto, a necessidade de uma medida permanente dos níveis plasmáticos da droga, com a finalidade de se manter a concentração plasmática (KAHAN, 1993).

A CSA exerce sua atividade imunossupressora através da ligação com uma família de receptores intracelulares, as ciclofilinas. O complexo CSA-ciclofilina se liga à enzima calcineurina inibindo sua atividade de fosfatase, o que previne a desfosforilação do fator NF-AT (do inglês *Nuclear Factor of Activated T cells*). Assim, este fator de transcrição deixa de translocar para o núcleo, e não ocorre a transcrição do gene da interleucina-2 (IL-2), citocina essencial para a progressão do ciclo celular em linfócitos T (HANDSCHUMACHER *et al.*, 1984; LIU *et al.*, 1991). Por esta ação, a CSA vem sendo utilizada na prevenção e tratamento de rejeição a transplantes, e em determinadas doenças auto-imunes (KAHAN, 1999; BACH, 1999).

### **1.3 – A nefrotoxicidade associada a Ciclosporina A**

A CSA é um imunossupressor eficaz, mas, apesar disto, apresenta como um importante efeito adverso a nefrotoxicidade, relatada na clínica e em estudos experimentais (MYERS, 1986; ROSSI, 1989). Esta toxicidade é freqüentemente observada em transplantes de diversos órgãos e em doenças auto-imunes, mas em transplante renal é mais freqüente e mais agressiva, isto pelas próprias condições do órgão transplantado em adaptação. As alterações que ocorrem agudamente após administração de CSA são dependentes da dose, e reversíveis com a retirada da mesma, mas persistem com o tratamento

crônico. Uma vez estabelecida, a nefrotoxicidade crônica (de ocorrência mais freqüente) é irreversível e pode progredir para estágios finais de insuficiência renal (BENNETT & PULLIAM, 1983).

Esta complicação induzida por CSA envolve alterações na hemodinâmica renal, caracterizadas, principalmente, pela vasoconstricção das arteríolas renais aferentes (pré-glomerulares), com conseqüente diminuição do fluxo plasmático renal e da taxa de filtração glomerular (ROSSI *et al.*, 1989); além de alterações túbulo-intersticiais, caracterizadas, principalmente, por fibrose intersticial e atrofia tubular, sendo o túbulo proximal a estrutura do néfron mais afetada. Estas alterações são muitas vezes mencionadas como resultantes das alterações vasculares, que ocorrem mais precocemente. Porém, apesar de um número considerável de trabalhos sobre o assunto, a fisiopatologia de todo o processo de nefrotoxicidade, incluindo os mecanismos moleculares, ainda não está bem entendida. O envolvimento do sistema renina-angiotensina tem sido investigado (DEL MORAL *et al.*, 1997), assim como a participação de citocinas como TGF- $\beta_1$  (JOHNSON *et al.*, 1999). Desde então, a predominância dos fatores vasculares vem sendo questionada.

Alguns autores demonstraram uma dissociação entre a alteração na taxa de filtração glomerular e a fibrose intersticial (ELZINGA *et al.*, 1993). Estes dados sugeriam que outros fatores, além dos hemodinâmicos, eram importantes para as alterações observadas no processo de nefrotoxicidade induzido pela CSA. Esses fatores poderiam representar efeitos diretos a células tubulares e a células intersticiais. Em 1999, Johnson e colaboradores estudaram os efeitos diretos da CSA na secreção de citocinas envolvidas na

fibrogênese, em cultura de fibroblastos corticais humanos. Este grupo concluiu que a CSA exerce um efeito importante de acúmulo de matriz extracelular, principalmente pelo aumento da síntese de colágeno pelas células estudadas. É importante observar que isto ocorreu *in vitro*, independente de fatores hemodinâmicos, e que o possível efeito direto a células tubulares ficou por ser elucidado.

#### **1.4 – A Ciclosporina A e a reversão da resistência a múltiplas drogas**

Além da atividade imunossupressora da CSA, outros efeitos biológicos (não relacionados necessariamente ao efeito clássico de inibição da enzima calcineurina) foram demonstrados, e um de destacada importância é sua ação como reversor do fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) (TWENTYMAN *et al.*, 1992).

#### **1.5 – O fenótipo de resistência a múltiplas drogas**

O fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) é caracterizado pela resistência que determinados tumores apresentam após exposição a quimioterápicos, ou mesmo na ausência desta exposição (resistência primária). A resistência a um agente determinado era resolvida na prática terapêutica pela administração de drogas de diferentes classes (quimioterapia de múltiplos agentes). Porém, o fenótipo MDR é diferenciado pelo fato de ser uma resistência cruzada a diversas substâncias não relacionadas quimicamente e



que exercem seus efeitos interagindo com diferentes alvos celulares. Portanto, nestes casos, a terapia de múltiplos agentes é ineficaz; e neste contexto a MDR representa a primeira causa de insucesso na quimioterapia do câncer (GOTTESMAN *et al.*, 1996).

MDR é um fenômeno multifatorial, que envolve mecanismos como: aumento do reparo de DNA, alterações na via da apoptose e diminuição do acúmulo de drogas. O mecanismo mais freqüentemente associado ao fenótipo MDR é conferido, principalmente, por duas proteínas de membrana: a glicoproteína-P (Pgp ou ABCB1), e a proteína associada à resistência a múltiplas drogas 1 (MRP 1 ou ABCC1) (LARSEN *et al.*, 2000). Estas proteínas apresentam homologia de apenas 15% entre suas estruturas primárias, mas apesar disto, alguns de seus substratos são comuns, e em células tumorais funcionam de forma semelhante, atuando como bombas na extrusão de drogas, impedindo o acúmulo destas drogas. Desta forma a substância em questão não atinge uma concentração intracelular suficiente para exercer a sua função letal (BELLAMY, 1996).

Os reversores (ou moduladores) do fenótipo MDR atuam inibindo a atividade das proteínas MDR, permitindo, assim, o acúmulo de seus substratos (BELLAMY, 1996). A CSA é conhecida por inibir a atividade da glicoproteína-P (TWENTYMAN *et al.*, 1992). Além desta substância, a trifluoperazina, um antagonista de calmodulina, que modula o fluxo de cálcio do retículo sarcoplasmático pela inibição da sua  $Ca^{2+}$ -ATPase, (DE MEIS, 1991) e o verapamil (VP), um bloqueador de canal de cálcio, (TSURUO *et al.*, 1982) compõem o grupo dos reversores de 1ª geração.

O uso dos reversores de 1ª geração foi limitado pela elevada toxicidade, que ocorria nas concentrações utilizadas para um efeito modulador substancial. Então, surgiram os moduladores de 2ª e 3ª gerações que se caracterizam pela menor toxicidade, e até os dias atuais novas substâncias com potencial para modulação vêm sendo estudadas (KRISHNA & MAYER, 2000).

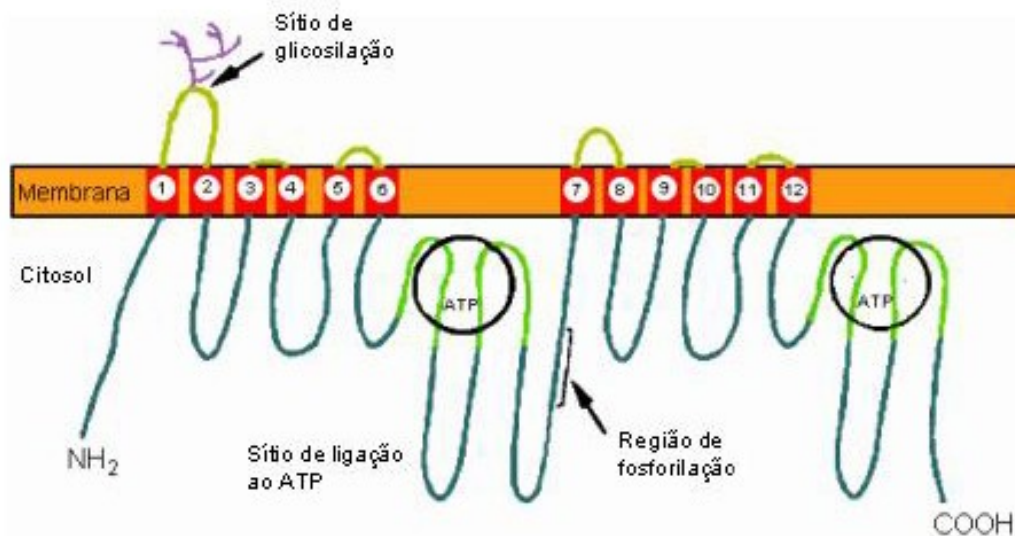
### **1.5.1 – A glicoproteína-P**

Proteínas transportadoras “Pgp-like” são altamente conservadas na evolução. São encontradas em arqueobactérias e em diferentes microorganismos patogênicos, onde provavelmente são responsáveis pela resistência a antibióticos (ENDICOTT & LING, 1989). Em mamíferos, a Pgp foi inicialmente descoberta por conferir resistência a múltiplas drogas em células tumorais (JULIANO & LING, 1976). Esta proteína recebeu o “P” de permeabilidade, pois se acreditava que sua atividade diminuía a permeabilidade da membrana celular.

A Pgp pertence à superfamília ABC (*ATP-binding cassette*) de transportadores de membrana (também chamados de ATPases de transporte). Esta família é, provavelmente, a maior família de proteínas responsáveis pelo movimento seletivo de solutos nas duas direções da membrana biológica, em ambos procariotos e eucariotos (HIGGINS, 1992). A Pgp é uma glicoproteína de 170 kDa, e como todos os membros da família ABC é dependente de ATP. Seus 1280 aminoácidos estão organizados em duas unidades repetidas de 610 aminoácidos, que são unidas por um segmento de 60 aminoácidos. Cada

unidade tem 6 segmentos transmembrana, um sítio de glicosilação na região extracelular, e um domínio hidrofílico contendo um sítio citoplasmático de ligação para o ATP (figura 2). Ambos os sítios de ligação de ATP são necessários para a atividade da proteína (GOTTESMAN *et al.*, 1996). Tem localização predominante na membrana plasmática, podendo ser encontrada, em menor quantidade, em organelas intracelulares (LARSEN *et al.*, 2000).

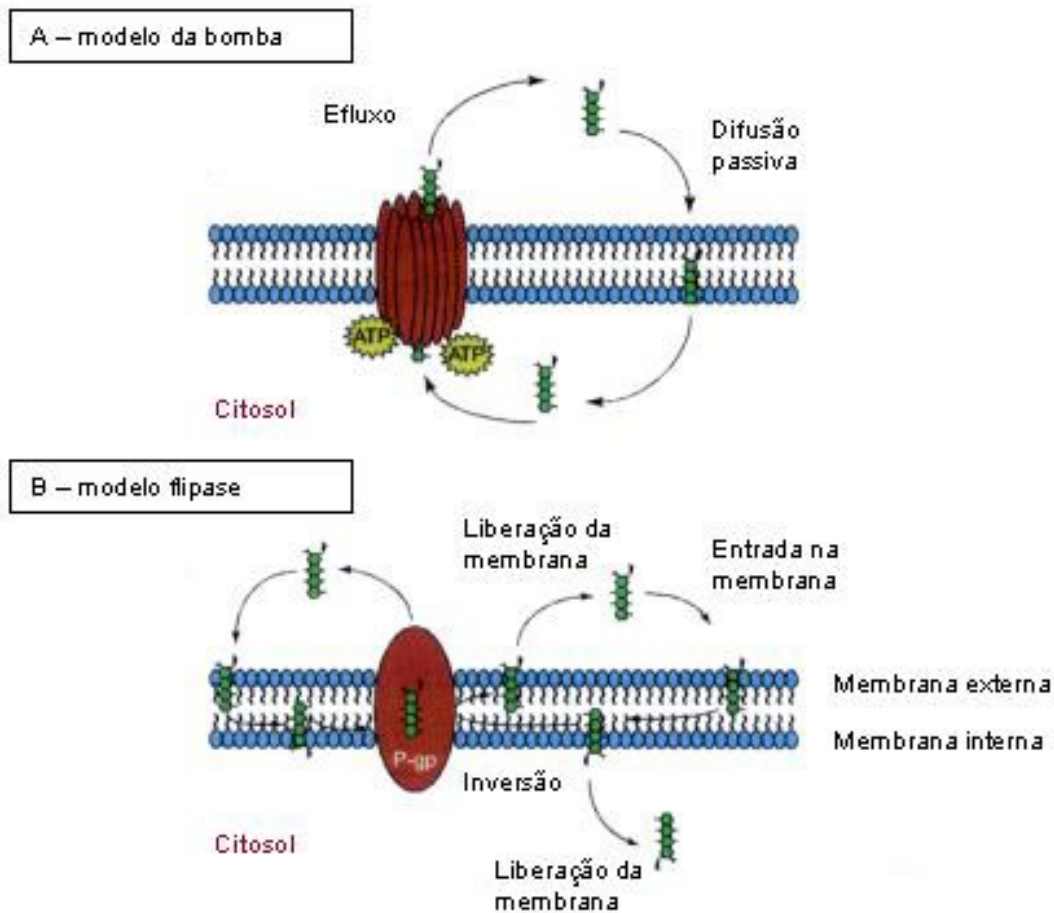
**Figura 2. Desenho esquemático da Pgp na membrana.** Adaptado de DI PIETRO *et al.*, 1999.



A proteína funcional transporta, a princípio, substâncias com características catiônicas e hidrofóbicas. A Pgp se diferencia por transportar diferentes classes de substratos, como drogas da quimioterapia do câncer, hormônios esteróides, inibidores de HIV protease, corantes fluorescentes e

agentes imunossupressores, para mencionar alguns (CHAUDHARY & RONINSON, 1991; UEDA *et al.*, 1992; SAEKI *et al.*, 1992; KIM *et al.*, 1998).

Com base em experimentos com células intactas, vesículas de membrana plasmática, ou reconstituição da proteína purificada, foram apresentados alguns modelos hipotéticos para o transporte de substratos pela Pgp. Entre estes, dois foram aceitos como possíveis modelos do mecanismo de ação da Pgp (figura 3). No “modelo da bomba” (figura 3A), a estrutura tridimensional da proteína formaria um poro, e o substrato seria transportado por meio deste poro do citosol para o meio extracelular. No “modelo flipase” (figura 3B), o substrato poderia interagir com lipídeos da membrana antes de interagir com a proteína, e sem alcançar o citosol o substrato seria transportado pela proteína para camada mais externa da membrana e então liberado, ou transportado diretamente para o meio extracelular (HIGGINS & GOTTESMAN, 1992; ALTENBERG *et al.*, 1994).



**Figura 3. Desenho esquemático dos modelos “modelo da bomba” e “modelo flipase”.** Adaptado de JOHNSTONE *et al.*, 2000.

Esta proteína é produto de uma pequena família de genes, com vários membros em diferentes espécies. Em humanos é representada pelo gene *MDR1*, e em camundongos os genes são *mdr1a* e *mdr1b* (BELLAMY, 1996).

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar novos substratos (SEELIG, 1998), mas também para identificar fatores, substratos ou não, capazes de induzir a expressão da Pgp. Esta indução pode ocorrer por

agentes químicos ou por estresse físico, assim como irradiação X (McCLEAN *et al.*, 1993), irradiação ultravioleta (UCHIUMI *et al.*, 1993) e choque térmico (CHIN *et al.*, 1990).

#### **1.5.1.1 – A glicoproteína-P em células normais**

Além da expressão da Pgp em células tumorais, ela também tem sido descrita em diversos tecidos normais, como rim, fígado, glândula adrenal, placenta, endotélio da barreira hematoencefálica e linfócitos, entre outros (CORDON-CARDO *et al.*, 1990). Em decorrência disto, o papel fisiológico desta proteína surgiu como um novo interesse de pesquisa.

Quando os estudiosos da área formularam e testaram hipóteses sobre um possível papel fisiológico para a Pgp, isto foi feito para cada tecido separadamente. De uma forma geral, o ponto comum entre tantos tecidos diferentes seria a função de proteção contra substâncias, potencialmente tóxicas, exógenas ou endógenas. No rim, por se tratar de um órgão tão importante para a excreção, parecia claro o papel da Pgp na proteção contra substâncias tóxicas.

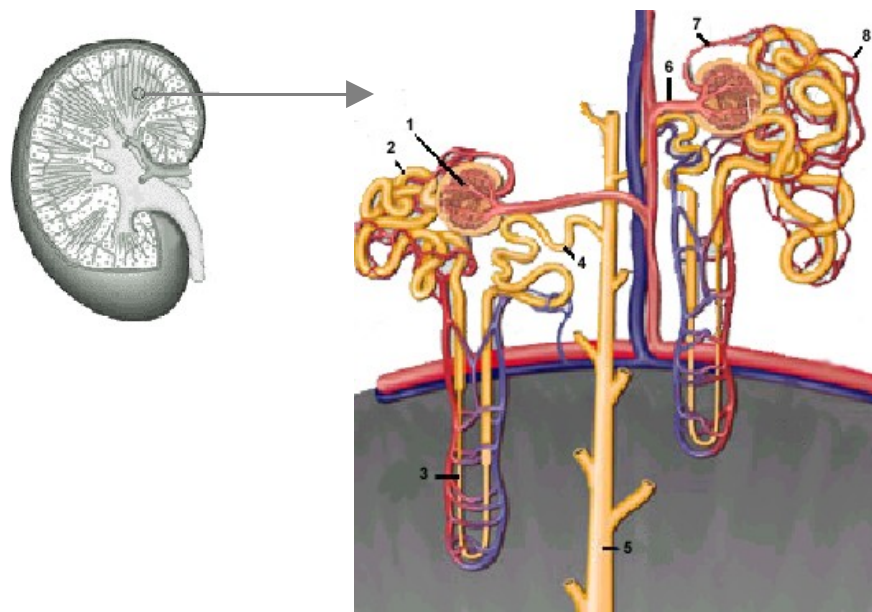
#### **1.5.1.2 – A glicoproteína-P e o sistema renal de secreção tubular**

O rim encerra diversos mecanismos de transporte que ocorrem em cada um dos segmentos tubulares renais. Este órgão desempenha uma função de extrema importância na excreção de drogas, toxinas e metabólitos endógenos

potencialmente tóxicos. Isto ocorre através dos processos de filtração glomerular e reabsorção e secreção tubulares (ITO, 1999).

O processo de secreção tubular é mediado por proteínas transportadoras localizadas nas membranas basolateral e apical, principalmente do túbulo proximal (figura 4, número 2). Para o transporte de cátions e ânions orgânicos estas proteínas foram divididas em dois sistemas, com base no tipo de substrato que transportam: o sistema transportador de cátions orgânicos (OCT), e o sistema transportador de ânions orgânicos (OAT). Muitas drogas e substâncias endógenas são classificadas como cátions e ânions orgânicos, e portanto são excretadas pelos referidos sistemas.

Muitos estudos vêm sugerindo que o movimento transepitelial (do capilar peritubular para o lúmen) de diversas substâncias ocorre através da cooperação entre proteínas localizadas na membrana basolateral, responsáveis pela captação das substâncias, e proteínas localizadas na membrana apical, responsáveis pelo efluxo para o lúmen (BERKHIN & HUMPHREYS, 2001).

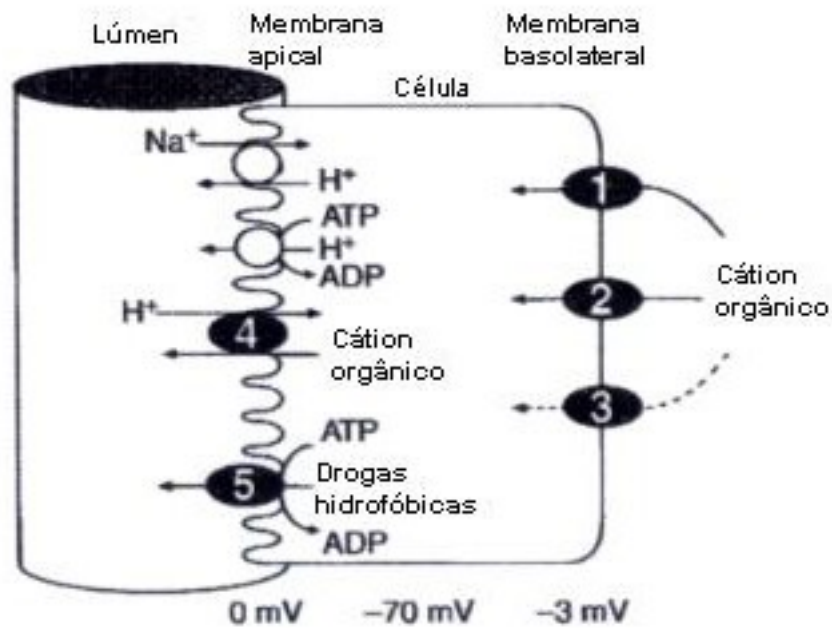


**Figura 4. Desenho esquemático de um rim com detalhe para a estrutura do néfron.** 1- glomérulo. 2 – túbulo proximal convoluto. 3 – porção descendente da alça de Henle. 4 – túbulo distal convoluto. 5 – ducto coletor. 6 – arteriola aferente. 7 - arteriola eferente. 8 – capilar peritubular. Adaptação ([www.gen.umn.edu/.../wa\\_wbc\\_nephron4.jpg](http://www.gen.umn.edu/.../wa_wbc_nephron4.jpg)) e ([www.kidney.ca/.../kidneys\\_en.gif](http://www.kidney.ca/.../kidneys_en.gif)).

No rim, a Pgp se localiza principalmente na membrana apical do túbulo proximal (figura 5, número 5) (DEL MORAL *et al.*, 1997); além disto, transporta cátions, inclusive alguns conhecidos substratos do sistema OCT, como, por exemplo, o verapamil (ITO *et al.*, 1999). Com base nestas características, inicialmente se sugeriu que a Pgp poderia ser um dos transportadores daquele sistema; mas, posteriormente, foi demonstrado que a Pgp tem muitos substratos exclusivos e é uma proteína diferente daquelas já identificadas no sistema OCT. Então, esta proteína foi classificada como mais um elemento no



processo de secreção renal, fundamental para a eliminação de uma grande lista de substâncias.



**Figura 5. Desenho esquemático de uma célula renal (de túbulo proximal). 1, 2 e 3 – transportadores dependentes de potencial localizados na membrana basolateral. 4 – transportador H<sup>+</sup>/cátions orgânicos. 5 – Pgp. Adaptação (INUI *et al.*, 2000).**

As enzimas envolvidas no metabolismo de drogas e as proteínas transportadoras relacionadas ao processo de secreção tubular estão freqüentemente associadas a processos de interação entre drogas, podendo determinar a eficácia e a toxicidade das mesmas. Diversos estudos têm sido

realizados associando-se substratos da Pgp, para uma avaliação da potencial interação droga-droga (INUI *et al.*, 2000).

Saeki e colaboradores, em 1992, estudaram o transporte transepitelial e o acúmulo de CSA em duas linhagens epiteliais renais, uma transfectada com o gene MDR1 (gene que codifica a Pgp em humanos), e sua parental. Estes pesquisadores observaram que, comparado à linhagem parental, o acúmulo de CSA era menor e o seu transporte era maior na linhagem transfectada. Estas observações deram base à sugestão de que a CSA, além de ser capaz de inibir a atividade da Pgp, é um substrato desta proteína. Além disto, a CSA também é substrato da enzima CYP3A4 (envolvida em seu metabolismo hepático) e capaz de inibir sua atividade (DAI *et al.*, 2004).

### **1.5.2 – A proteína associada à resistência a múltiplas drogas 1**

Aproximadamente 10 anos após a descoberta da Pgp, foi descrita outra proteína transportadora, denominada MRP1, capaz de conferir resistência cruzada em células tumorais que não expressavam Pgp (McGRATH & CENTER, 1987).

A MRP1 foi caracterizada como uma proteína transportadora de 190 kDa, dependente de ATP, produto do gene *mrp*, e assim como a Pgp pertence a família ABC de transportadores. Seus 1531 aminoácidos estão organizados em 4 domínios transmembrana, seguidos por duas unidades repetidas, cada qual com 6 domínios transmembrana e 1 sítio de ligação ao ATP. Esta proteína

transporta, preferencialmente, substâncias conjugadas a glutatona, outras substâncias aniônicas e sais biliares conjugados (LARSEN *et al.*, 2000).

## ***2. Justificativa e Objetivo***

---

A nefrotoxicidade induzida pela CSA é um processo bastante complexo, que envolve alterações vasculares, intersticiais e tubulares. Seu estudo é relevante principalmente quando se considera o fato de que este efeito adverso ocorre no transplante de diversos órgãos e em doenças auto-imunes; e que as alterações verificadas na nefrotoxicidade associada a CSA também são observadas com o uso de outras drogas imunossupressoras, como, por exemplo, o FK-506.

A fisiopatologia do processo de nefrotoxicidade ainda não está completamente esclarecida, especialmente no que se refere às alterações tubulares. A CSA, apesar de ser metabolizada no fígado, tem um acúmulo importante no rim, sendo sua eliminação por este órgão associada muitas vezes à severidade das lesões associadas a nefrotoxicidade.

Portanto, a partir do conhecimento de que a CSA é capaz de inibir a Pgp, além de ser um substrato da mesma; de que esta proteína participa do processo de secreção tubular; e também da grande lista de substâncias potencialmente tóxicas, exógenas e endógenas, que são transportadas por esta proteína, chegamos ao questionamento sobre um possível papel da inibição da Pgp na nefrotoxicidade induzida pela CSA.

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo dos efeitos citotóxico e modulador da CSA em três linhagens epiteliais renais que diferem na expressão constitutiva da Pgp.

Como objetivos específicos:

- Avaliar a atividade da Pgp nas três linhagens.

- Avaliar o efeito modulador da CSA na atividade da Pgp. Avaliar se o efeito é reversível pela retirada da CSA.

- Avaliar o efeito da CSA sobre a viabilidade das linhagens, observando possíveis diferenças de sensibilidade entre as mesmas.

### ***3. Material e Métodos***

---

### 3.1 – Material

#### 3.1.1 - Soluções e Reagentes

Meio de Cultura - meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com baixa concentração de glicose. O meio de cultura era preparado da seguinte forma (em g/L de solução): 9,98 DMEM (Gibco); 0,3 L-Glutamina (Gibco); 0,2 NaHCO<sub>3</sub> (Cinética Química, Brasil); 3,0 HEPES (Sigma). Foi adicionada água Milli-Q q.s.p. 1litro. A solução teve o pH ajustado para 7,4, utilizando NaOH ou HCl.

Solução salina tamponada (PBS) - o PBS era preparado da seguinte forma em g/L de solução: 8,0 NaCl (Vetec, Brasil); 0,2 KCl (Reagen, Brasil); 2,17 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Reagen, Brasil); 0,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Reagen, Brasil). Foi adicionada água Milli-Q q.s.p. 1litro. A solução teve o pH ajustado para 7,2, utilizando NaOH ou HCl.

Soro fetal bovino (SFB) - fornecido por Gibco. Mantido a -20°C até o uso. Sua utilização no meio de cultura foi feita a 10% (v/v).

Tripsina-EDTA - fornecida por Gibco. A solução estoque 10X concentrada (0,5% tripsina, 5,3 mM EDTA) foi mantida a -20°C. Para o uso, a solução foi diluída 10X em PBS e mantida a 4°C.

MTT [Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol] – fornecido por Sigma. Para o uso foi preparada uma solução estoque 5 mg/ml em PBS e mantida a 4°C.

Dimetilsulfóxido (DMSO) – fornecido por Sigma – utilizado a 100%.



MTG – fornecido por Molecular Probes. Solução estoque de 1 mM diluída em DMSO e mantida a -20°C.

Ro-123 – fornecida por Sigma. Solução estoque de 0,5 mg/ml diluída em PBS e mantida a -20°C.

CSA – fornecida por Sigma. Solução estoque de 50 mM diluída em DMSO e mantida a -20°C.

### **3.1.2 – Células**

Para este estudo foi utilizado um modelo composto por três linhagens epiteliais renais de origens distintas e com diferenças de expressão de Pgp e MRP1. LLC-PK1 é uma linhagem celular derivada de rim de porco, com características de túbulo proximal, que não expressa substancialmente MRP1 ou Pgp (VAN DER SANDT *et al.*, 2000; GOH *et al.*, 2002). MDCK é uma linhagem celular tubular derivada de rim de cão; não expressa MRP1 e expressa níveis médios de Pgp (ITO *et al.*, 1999; GOH *et al.*, 2002). Ma104 é uma linhagem celular de rim de embrião de macaco *Rhesus*, e expressa altos níveis de Pgp e MRP1 (CAPELLA *et al.*, 1999; CAPELLA *et al.*, 2001).

## **3.2 – Métodos**

### **3.2.1 - Condições de cultura**

As células cresceram em meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB), em garrafas de poliestireno (25 cm<sup>2</sup>), a 37°C. As células foram sub-cultivadas utilizando tripsina-EDTA (0,05% - v/v) a cada 3-4 dias. Para cada experimento foram utilizadas garrafas de células semiconfluentes e as mesmas condições de meio e soro.

### **3.2.2 – Avaliação da viabilidade celular**

Para a medida de viabilidade celular foi utilizado o método colorimétrico-MTT, descrito por Mosmann em 1983. O MTT é um sal que tem como característica um anel tetrazolium que é clivado por desidrogenases da mitocôndria em atividade, tendo o cristal de formazana, um produto de cor, como resultante. A quantidade final de formazana é diretamente proporcional ao número de células viáveis, em uma população homogênea. Desta forma é possível medir apenas células vivas com mitocôndria em atividade.

As células foram preparadas a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/ml, em placas de 96 poços (200 µl/poço) e incubadas a 37°C. Os experimentos foram realizados após 24 horas de incubação para permitir a adesão das células à placa de cultura.

As linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104 eram incubadas com CSA nas concentrações 0,1, 0,5 , 1 , 5, 10, 25, e 50  $\mu$ M, por 48 horas a 37°C. A concentração final de DMSO não excedeu 0,1%. Ao final do tratamento eram adicionados 20  $\mu$ l da solução de MTT (5 mg/ml) em cada poço, e as células incubadas, protegidas de luz, por 3 horas a 37°C. Após este tempo, o sobrenadante era desprezado e os cristais formados solubilizados com 200  $\mu$ l de DMSO (Dimetilsulfóxido). As placas eram, então, levadas para leitura da absorbância no comprimento de onda de 490 nm, em um aparelho de ELISA para microplacas. Cada experimento foi repetido três vezes e feito em triplicatas.

### **3.2.3 – Avaliação do acúmulo intracelular de Rodamina 123**

Os testes de retenção e extrusão do corante Rodamina 123 (Ro-123) foram realizados para a medida do efeito modulador da CSA sobre a atividade da Pgp.

Foi verificado inicialmente, por Neyfakh em 1988, que linhagens de células resistentes apresentavam menor acúmulo de determinados corantes quando comparadas com as sensíveis. Foi sugerido então, que a interação com os corantes mimetizava a interação com drogas, e por isto determinados corantes poderiam funcionar como sondas moleculares para estudos de atividade das proteínas envolvidas no fenótipo de resistência. A Rodamina 123 (Ro-123) é um corante fluorescente que se acumula na mitocôndria de uma forma dependente do potencial de membrana mitocondrial. Este corante foi

descrito como substrato da Pgp e vem sendo utilizado como a principal sonda molecular em estudos de atividade desta proteína.

As células foram preparadas a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/ml, em placas de 24 poços (1 ml/poço) e incubadas a 37°C. Os experimentos foram realizados após 24 horas de incubação para permitir a adesão das células à placa de cultura.

Para os testes de medida de acúmulo do corante, as células eram incubadas por 30 minutos com Ro-123 (400 ng/ml). Para a avaliação do acúmulo máximo, as células eram incubadas na presença de diferentes concentrações de CSA por 30 minutos, e por mais 30 minutos com Ro-123 (400 ng/ml) na presença das mesmas concentrações de CSA.

Para os testes de extrusão, era adicionado Ro-123 e as células incubadas por 30 minutos a 37°C (tempo de acúmulo). Após este tempo, o meio era substituído por meio novo livre de Ro-123 e as células incubadas por mais 30 minutos (tempo de extrusão). A CSA era adicionada em diferentes concentrações e diferentes momentos de incubação. Para o ensaio clássico a CSA era adicionada no período de incubação com Ro-123 e no tempo de extrusão. Além do ensaio clássico, foram realizados ensaios com novas dinâmicas de tempo; 30 minutos de incubação com CSA em diferentes momentos: antes da incubação com Ro-123 (pré-incubação); durante a incubação com Ro-123 (co-incubação); e depois da incubação com Ro-123 (pós-incubação).

Ao final de todos os ensaios, o meio era retirado, as células eram lavadas uma vez com PBS (1 ml/poço), removidas do substrato e separadas

com tripsina-EDTA por aproximadamente 5 minutos a 37°C, transferidas para tubos e mantidas no gelo até o momento da leitura. A intensidade de fluorescência intracelular era medida por citometria de fluxo, usando sinais de fluorescência na cor verde (aproximadamente 530 nm); em um citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, EUA). A excitação das amostras foi realizada por laser de argônio ajustado para emitir 15 mW a 488 nm. Além da fluorescência intracelular eram avaliados parâmetros como tamanho e granulosidade celular.

#### **3.2.4 - Avaliação da massa mitocondrial**

O corante fluorescente MTG foi utilizado para medidas de massa mitocondrial nas três linhagens estudadas. Este corante se acumula na mitocôndria independentemente de variações no potencial de membrana mitocondrial (HAUGLAND, 2002).

As células foram preparadas a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/ml, em placas de 24 poços (1 ml/poço) e incubadas a 37°C. Os experimentos foram realizados após 24 horas de incubação para permitir a adesão das células à placa de cultura. As células eram, então, incubadas com MTG (50 nM) por 30 minutos. Para avaliar o possível efeito da CSA sobre o acúmulo de MTG, as células eram incubadas na presença de CSA por 30 minutos, e por mais 30 minutos com MTG (50 nM) na presença da mesma concentração de CSA. A análise por citometria de fluxo era feita como descrito para Ro-123.

### 3.2.5 - Microscopia de fluorescência

Microscopia de fluorescência foi utilizada para a visualização do acúmulo e distribuição dos corantes Ro-123 e MTG, assim como o efeito da CSA sobre o acúmulo e localização destes corantes.

As células foram preparadas a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/ml, em placas de Petri de 25 mm especialmente desenvolvidas para este tipo de microscopia (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000) (2 ml/placa) e incubadas a 37°C. Os experimentos foram realizados após 24 horas de incubação, para permitir a adesão das células à placa de cultura.

Para Ro-123 foi realizado o ensaio clássico de extrusão de Ro-123. As células eram incubadas por 30 minutos com Rho-123 a 37°C. Após este tempo, o meio era substituído por meio novo livre de Ro-123 e as células incubadas por mais 30 minutos. A CSA era adicionada no período de incubação com Ro-123 e no tempo de extrusão.

Para MTG, as células eram incubadas com MTG (50 nM) por 30 minutos. Além deste tratamento, as células eram incubadas na presença de CSA por 30 minutos, e por mais 30 minutos com MTG (50 nM) na presença da mesma concentração de CSA.

Após os períodos de incubação a fluorescência celular era visualizada através de um microscópio Axiovert 100 com epifluorescência (Zeiss, Alemanha), através de uma lente objetiva de imersão com ganho de 40X (Zeiss, Alemanha).

### **3.2.6 – Análise estatística**

Os resultados foram expressos em médias  $\pm$  erro padrão de no mínimo 3 experimentos. Foi realizado um teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste-*t* de Bonferroni, e foram considerados estatisticamente significantes os valores de  $p < 0,05$ .

## ***4. Resultados***

---



#### 4.1 - Efluxo de Rodamina 123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104

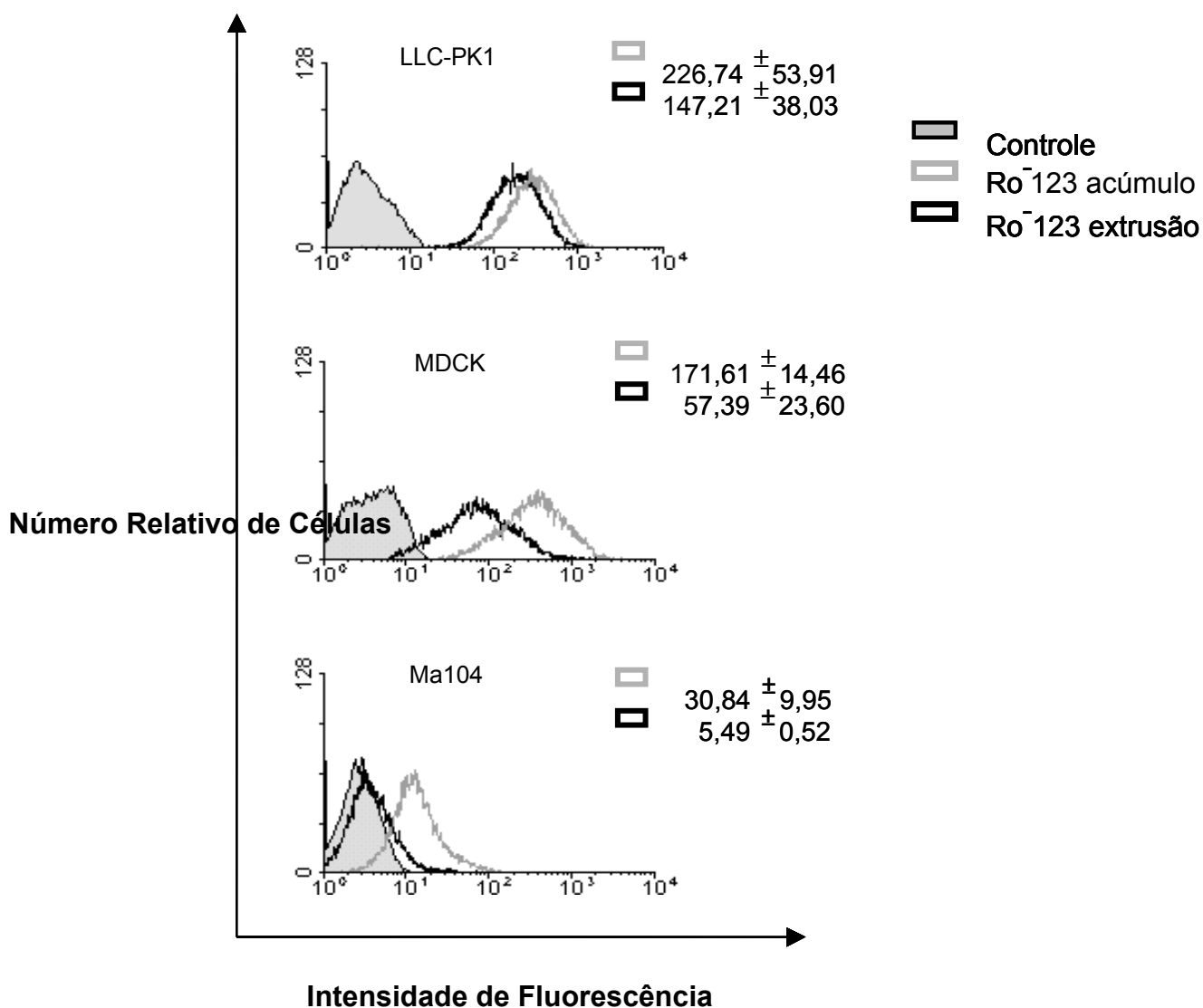
De acordo com a literatura as três linhagens renais utilizadas neste estudo compõem um modelo de baixa, média e alta expressão de Pgp. LLC-PK1 é uma linhagem de túbulo proximal que apresenta baixos níveis de expressão de Pgp, segundo alguns autores (DECORTI *et al.*, 2001); apesar disto, em outros trabalhos foi demonstrado que esta linhagem ou não expressa Pgp ou expressa níveis insuficientes para detecção pelas técnicas utilizadas (VAN DER SANDT *et al.*, 2000). MDCK é uma linhagem epitelial que apresenta níveis médios de expressão de Pgp, segundo um estudo que comparou a expressão de Pgp entre esta linhagem e as linhagens LLC-PK1 (baixos níveis de expressão de Pgp) e NIH 3T3 MDR1 (altos níveis de expressão de Pgp) (ITO *et al.*, 1999). Ma104 é uma linhagem embrionária, epitelial, que expressa altos níveis de Pgp, como verificado em estudo de nosso grupo comparando os níveis de expressão de Pgp desta linhagem com os níveis de expressão da linhagem resistente K562-Lucena 1 (altos níveis de expressão de Pgp) (CAPELLA *et al.*, 1999). Além da expressão de Pgp foi verificado, também por nosso grupo, em um segundo estudo, altos níveis de expressão de MRP1 nas células Ma104 (CAPELLA *et al.*, 2001).

O efluxo de Ro-123 foi analisado para as três linhagens. Para isto, as células foram incubadas por 30 minutos com Ro-123, para uma medida do quanto é acumulado, e por mais 30 minutos livres do corante, para a medida da capacidade de extrusão das células.

Na figura 6 é possível observar que Ma104 acumulou significativamente menos Ro-123 do que LLC-PK1 e MDCK nos 30 minutos iniciais do ensaio. Além disto, após 30 minutos de incubação livre de corante, os níveis de fluorescência da linhagem Ma104 ficaram próximos dos níveis de autofluorescência (linhas pretas), sugerindo que ocorreu o efluxo de quase todas as moléculas de Ro-123.

Também é possível notar que houve pequena diferença no acúmulo de Ro-123 entre as linhagens LLC-PK1 e MDCK (cinza) nos trinta minutos iniciais do ensaio; contudo, após a retirada do corante, os níveis de fluorescência de MDCK diminuíram, enquanto os de LLC-PK1 pouco alteraram (linhas pretas), sugerindo um efluxo de Ro-123 muito pequeno para a linhagem LLC-PK1 e um efluxo significativo para a linhagem MDCK.

Em conclusão, encontramos relação entre a expressão de Pgp relatada na literatura e o efluxo de Ro-123, na seguinte ordem: Ma104 > MDCK > LLC-PK1. Este resultado mostra o potencial deste modelo para o nosso estudo. Mas, quando comparamos o acúmulo inicial de Ro-123 (sem extrusão) entre as linhagens LLC-PK1 e MDCK, observamos um acúmulo muito semelhante, apesar das diferenças de expressão de Pgp mostradas em estudos da literatura.



**Figura 6. Efluxo de Rodamina 123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104.** As células foram preparadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^5$  cels/ml), incubadas com Ro-123 (400 ng/ml) por 30 min. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS, e incubadas por mais 30 min em meio, para extrusão do corante. As células foram então lavadas com PBS, retiradas da placa com tripsina-EDTA, e a fluorescência intracelular medida por citometria de fluxo. Cinza opaco – controle - células não tratadas (autofluorescência); cinza – acúmulo de Ro-123 - células incubadas com Ro-123 por 30 min; preto – Ro-123 extrusão - células incubadas com Ro-123 por 30 min, mais 30 min livres de Ro-123. Experimento representativo. No detalhe está apresentado média e erro padrão de três experimentos,  $n=3$ .

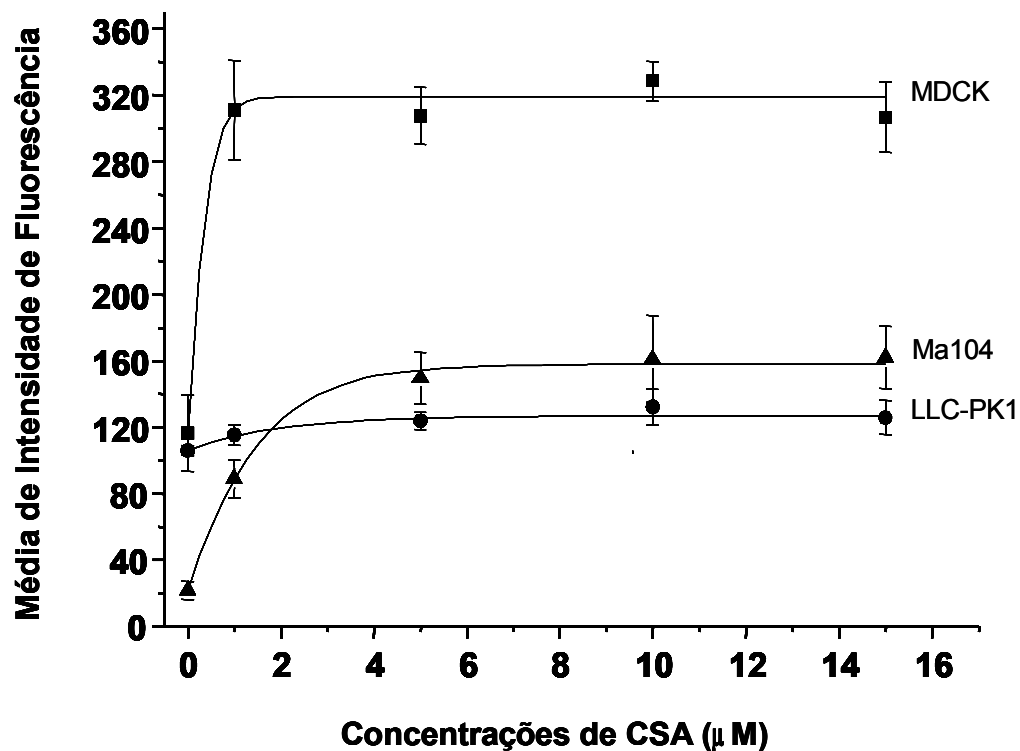
## **4.2 – Acúmulo máximo de Rodamina 123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104**

Após a observação de Neyfakh, em 1988, de que linhagens resistentes a múltiplas drogas acumulavam menos Ro-123 do que as linhagens sensíveis, e da sugestão de que determinados corantes poderiam ser utilizados como sondas moleculares para o estudo do fenótipo MDR, a Rodamina 123 foi classificada como mais um substrato da Pgp, e passou a ser utilizada nos estudos que envolviam medidas de atividade desta proteína. Mas, além disto, a Ro-123 é um corante fluorescente que tem como alvo celular a mitocôndria, e era utilizado como marcador mitocondrial (CHEN *et al.*, 1982). Portanto, diferenças de massa ou atividade mitocondrial entre células também poderiam resultar em diferenças de acúmulo deste corante. Sendo assim, apesar das diferenças de efluxo observadas na figura 6 estarem de acordo com o nível de expressão de Pgp de cada linhagem celular, não poderíamos excluir possíveis diferenças de massa mitocondrial entre as linhagens utilizadas. As células que acumularam menos Ro-123 (Ma104) poderiam ter menor massa mitocondrial e por isto poderiam estar acumulando menos corante; e, ao contrário, as células que acumularam mais (LLC-PK1 e MDCK) poderiam ter maior massa mitocondrial.

Então, com o objetivo de avaliar possíveis diferenças de massa mitocondrial entre as linhagens estudadas, eliminando a interferência da atividade da Pgp nos resultados de acúmulo de Ro-123, os ensaios foram realizados em presença de CSA – para inibir a atividade da proteína.

Para isto as células foram incubadas com diferentes concentrações de CSA por 30 minutos, mais 30 minutos com Ro-123 mantendo a CSA nas mesmas concentrações. Desta forma, quando o acúmulo estivesse em fase de saturação, as três linhagens estariam nas mesmas condições de acúmulo de Ro-123, sem que este corante estivesse sendo transportado pela Pgp. E este seria o acúmulo máximo para uma comparação inicial de massa mitocondrial entre as linhagens.

Na figura 7 é possível observar que em 30 minutos, na ausência do inibidor, MDCK e LLC-PK1 mostram acúmulo semelhante de Ro-123, sendo possível observar também que Ma104 tem um acúmulo bastante menor do que o das outras duas linhagens, o que está de acordo com os dados apresentados na figura 6. Na presença do inibidor, o acúmulo da linhagem LLC-PK1 está um pouco maior quando comparado com o controle (ausência do inibidor), e para MDCK e Ma104 o acúmulo está bastante aumentado quando comparado com seus controles (ausência do inibidor). Para as linhagens LLC-PK1 e MDCK não há diferença de acúmulo de Ro-123 para concentrações de CSA a partir de 1  $\mu$ M, sugerindo uma saturação, o que só ocorre para Ma104 com concentrações de CSA acima de 5  $\mu$ M. Considerando os pontos de CSA 5  $\mu$ M, onde o acúmulo de Ro-123 é máximo para as três linhagens notamos que MDCK tem o maior acúmulo, enquanto LLC-PK1 e Ma104 têm os valores de acúmulo aproximadamente iguais. Isto sugere que as linhagens Ma104 e LLC-PK1 têm massa mitocondrial equivalente, e que MDCK tem a maior massa mitocondrial.



**Figura 7. Acúmulo máximo de Rodamina 123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104.** As células foram preparadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^5$  cels/ml), incubadas com CSA (1, 5, 10 e 15  $\mu$ M) por 30 min. Após este tempo, as células foram incubadas por mais 30 min com Ro-123 (400 ng/ml) na presença das mesmas concentrações de CSA. As células foram então lavadas com PBS, retiradas da placa com tripsina-EDTA, e a fluorescência intracelular medida por citometria de fluxo. LLC-PK1 (●), MDCK (■) e Ma104 (▲). Média e erro padrão de três experimentos, n=3.

### **4.3 – Massa mitocondrial das linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104**

A Ro-123 é um corante fluorescente que tem como alvo celular a mitocôndria, e foi bastante utilizada como marcador mitocondrial. Porém, a Rodamina 123 é uma substância catiônica que tem seu acúmulo dependente de potencial de membrana mitocondrial, e portanto, os resultados apresentados na figura 7 poderiam estar revelando diferenças de atividade mitocondrial, devido a diferenças de potencial de membrana mitocondrial. Assim, o maior acúmulo de Ro-123 pela linhagem MDCK poderia ser devido a um potencial de membrana mitocondrial mais favorável à entrada de cátions, e não por ter maior massa mitocondrial.

Para avaliar esta possibilidade utilizamos um corante fluorescente, MTG, que se acumula na mitocôndria e reage com grupamentos tióis disponíveis presentes em peptídeos e proteínas. Desta forma, o MTG mede massa mitocondrial de forma independente de potencial. Foi realizado um ensaio de acúmulo de MTG por 30 minutos para uma comparação entre as três linhagens estudadas.

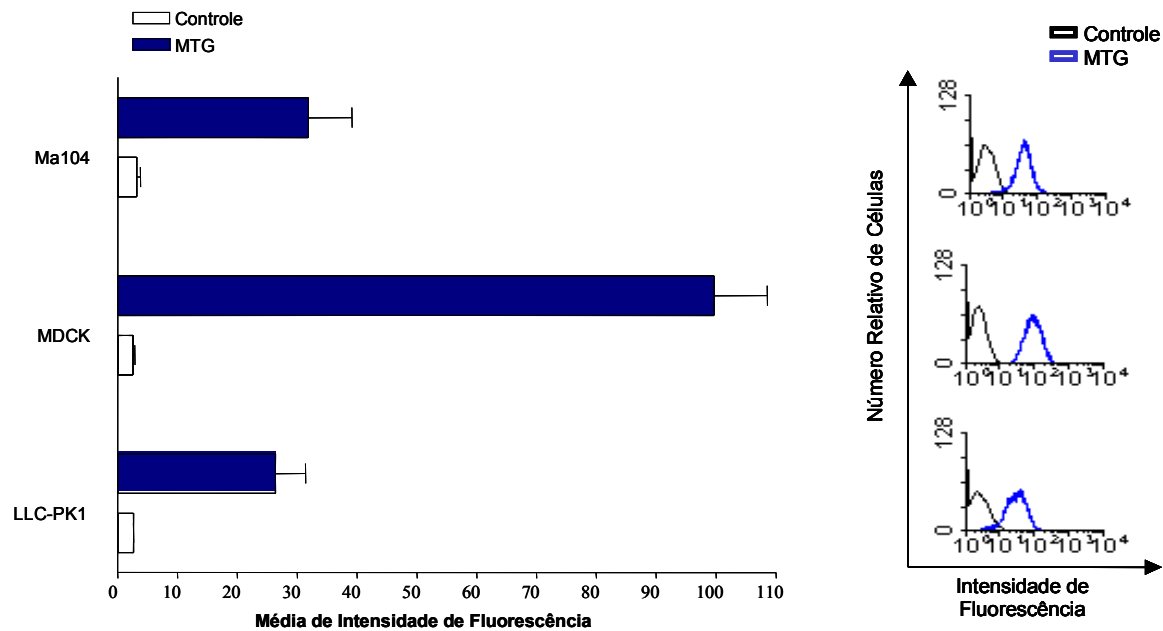
Na figura 8 é possível observar claramente que o acúmulo de MTG nas linhagens LLC-PK1 e Ma104 foi semelhante, enquanto o acúmulo da linhagem MDCK foi muito maior. Estes resultados confirmam os da figura 7 e sugerem que o maior acúmulo de Ro-123 pelas células MDCK realmente ocorre devido a maior massa mitocondrial e não a diferenças de potencial de membrana mitocondrial.

Estes mesmos experimentos foram realizados na presença de CSA na concentração de 5  $\mu$ M e não foi observado efeito da CSA sobre o acúmulo de MTG (dados não mostrados), o que sugere que este corante não está sendo transportado pela Pgp, ao menos nestas condições.

Os resultados mostrados nas figuras 7 e 8 indicam que as células Ma104 e LLC-PK1 apresentam similar massa mitocondrial. Entretanto, o acúmulo de Ro-123 observado nas células Ma104, após 30 minutos de extrusão (figura 6), é menor do que aquele das células LLC-PK1, o que reforça nossa sugestão inicial que associa o efluxo de Ro-123 a atividade funcional da Pgp.

Embora a massa mitocondrial das células MDCK seja maior do que a das células LLC-PK1 (figura 8), o acúmulo de Ro-123 observado em 30 minutos é similar para as duas células, e o acúmulo após 30 minutos de extrusão é menor para MDCK (figura 6). Isto sugere que estas células apresentam maior capacidade de transportar o substrato Ro-123.





**Figura 8. Massa mitocondrial das linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104.** As células foram preparadas em placas de 24 poços (1x10<sup>5</sup> cels/ml), incubadas com MTG (50 nM) por 30 min. As células foram então lavadas com PBS, retiradas da placa com tripsina-EDTA, e a fluorescência intracelular medida por citometria de fluxo. Controle – células não tratadas (autofluorescência); MTG – células incubadas com MTG por 30 min. Média e erro padrão de três experimentos, n=3. No detalhe (à direita) experimento representativo.

#### 4.4 – Visualização do acúmulo e localização do corante MTG

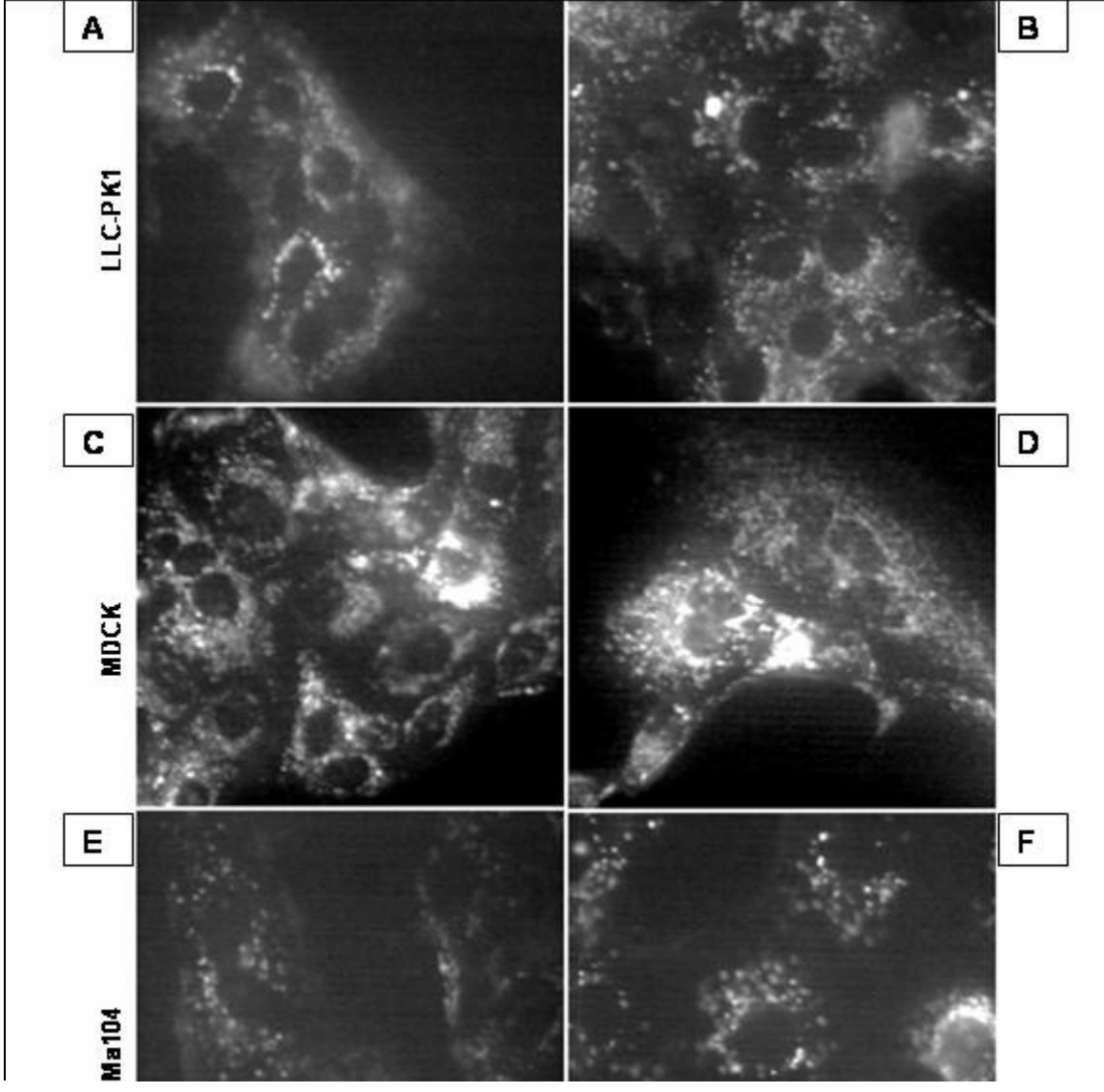
Por citometria de fluxo é possível medir a intensidade de fluorescência intracelular total. Para acrescentar dados de localização, realizamos o ensaio de acúmulo de MTG para observação por microscopia de fluorescência.

Para isto as células foram incubadas com MTG por 30 minutos em placas especiais para este tipo de microscopia.

A figura 9 mostra, para as três linhagens, a marcação mitocondrial do corante. Também pode ser observado o maior acúmulo da linhagem MDCK quando comparado com as linhagens LLC-PK1 e Ma104, como demonstrado nos experimentos de citometria de fluxo apresentados na figura 8.

Estes mesmos experimentos foram realizados na presença de CSA na concentração de 5  $\mu$ M. Nestes experimentos não foi observado nenhum efeito da CSA sobre o acúmulo ou localização de MTG (dados não mostrados).





**Figura 9. Acúmulo e localização do corante MTG.** As células foram preparadas em placas de Petri especialmente desenvolvidas para este tipo de microscopia ( $1 \times 10^5$  cels/ml), incubadas com MTG (50 nM) por 30 min. **A, B** – LLC-PK1; **C, D** – MDCK; **E, F** – Ma104. E observadas em um microscópio Axiovert 100 com epifluorescência (Zeiss, Alemanha), através de uma lente objetiva de imersão com ganho de 40X.

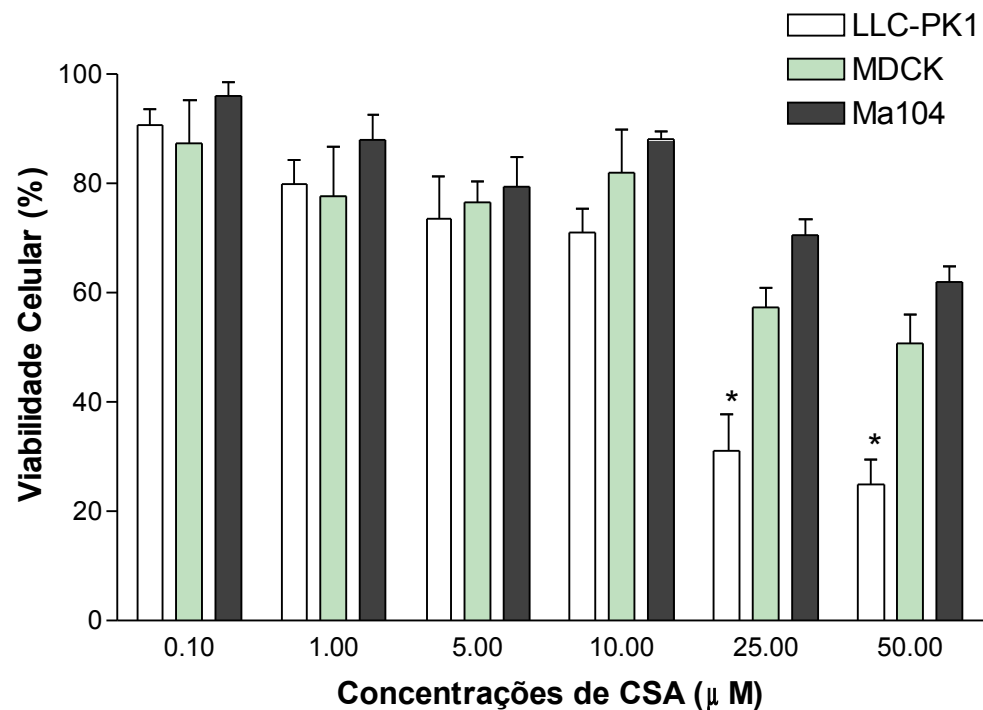
#### 4.5 - Efeito da Ciclosporina A sobre a viabilidade celular das linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104

Apesar de alguns autores sugerirem que as células renais sobrevivam à citotoxicidade induzida pela CSA por duas vias de detoxificação desta substância - metabolismo via sistema enzimático (WILKINSON, 1996) e efluxo via transportadores de membrana, incluindo a Pgp (SAEKI *et al.*, 1992) - não está claro se diferentes níveis de expressão de Pgp representam maior ou menor resistência aos efeitos citotóxicos da CSA. De acordo com dados recentes da literatura a linhagem LLC-PK1 apresenta baixos níveis de expressão de Pgp (VAN DER SANDT *et al.*, 2000; GOH *et al.*, 2002), a linhagem MDCK apresenta níveis médios de expressão de Pgp (ITO *et al.*, 1999; GOH *et al.*, 2002), e a linhagem Ma104 altos níveis de expressão de Pgp (CAPELLA MA *et al.*, 1999; CAPELLA MA *et al.*, 2001).

Logo, neste estudo as células LLC-PK1, MDCK e Ma104 foram testadas quanto a sensibilidade à CSA, de forma comparativa, com base na suposição de que a Pgp estaria alterando o acúmulo intracelular da droga. Para isto a viabilidade celular foi medida após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de CSA - de 0,1 até 50  $\mu\text{M}$ .

Na figura 10 está apresentado o percentual de viabilidade, o qual foi calculado dividindo a absorbância das células tratadas com CSA pela absorbância das células que não receberam tratamento (controle) e multiplicando o quociente por 100. Com base nestes resultados é possível notar que para as concentrações de CSA de 0,1 até 5  $\mu\text{M}$  ocorreu uma discreta

redução na viabilidade celular para as três linhagens, sem diferenças de sensibilidade entre as mesmas. Entretanto, para as concentrações mais altas – a partir de 10  $\mu$ M - o efeito citotóxico ou antiproliferativo aparece de forma inversamente proporcional à expressão de Pgp. A linhagem de maior expressão de Pgp, Ma104, apresentou a maior resistência; e a linhagem de menor expressão, LLC-PK1, apresentou a maior sensibilidade.



**Figura 10. Efeito da Ciclosporina A sobre a viabilidade celular das linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104.** As células foram preparadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^5$  cels/ml), incubadas com CSA (0,1; 1; 5; 10; 25 e 50  $\mu$ M) por 48 horas. Após este tempo, a viabilidade celular foi medida pelo método colorimétrico MTT. No eixo das ordenadas está representado o percentual de viabilidade em relação ao controle (células não tratadas com CSA), o controle foi considerado 100% de viabilidade e omitido nesta figura. LLC-PK1 – barras brancas, MDCK – barras verdes, e Ma104 – barras pretas. Média e erro padrão de três experimentos,  $n=3$ . \*  $p < 0,05$  LLC-PK1 vs MDCK e vs Ma104.



Estudando o efeito da CSA sobre a viabilidade de três linhagens epiteliais renais (figura 10), observamos que para as menores concentrações de CSA (até 1  $\mu\text{M}$ ) não houve um efeito citotóxico direto. Estas concentrações estão dentro da faixa de relevância para concentrações plasmáticas de CSA. Além disto, para a concentração de CSA de 5  $\mu\text{M}$ , que está dentro da faixa de concentrações de CSA que podem ser alcançadas no rim, de até oito vezes a maior concentração plasmática (LENSMEYER *et al.*, 1991; KOVARIK *et al.*, 1994), a redução de viabilidade foi pequena. Portanto, a toxicidade da CSA pode não ser causada por danos diretos as células tubulares renais, mas outro efeito, talvez indireto, poderia estar envolvido.

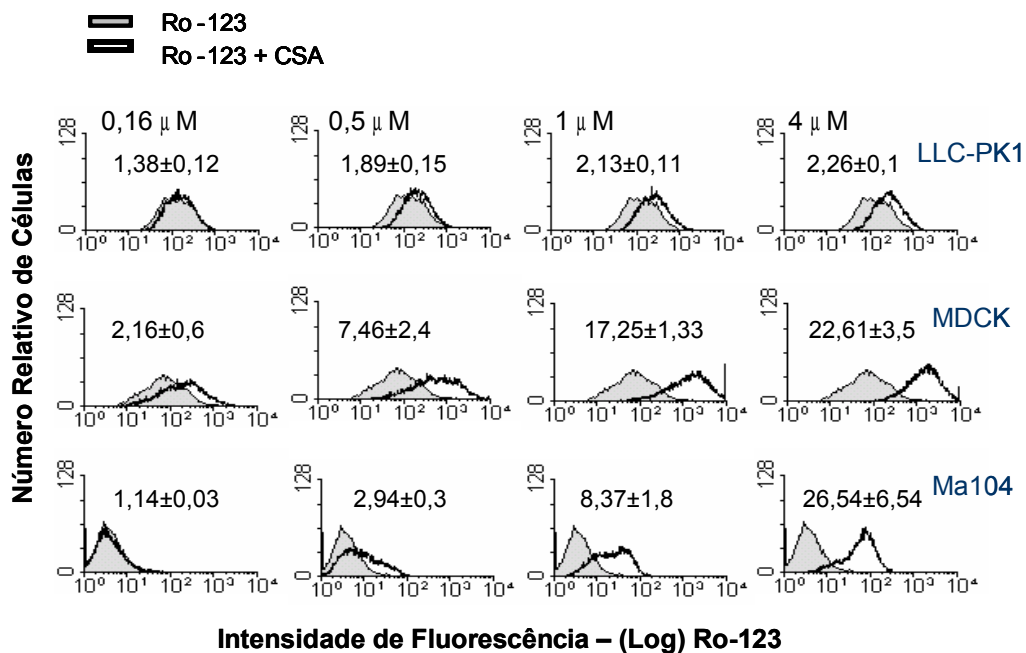
#### **4.6 - Efeito da Ciclosporina A no efluxo de Rodamina 123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104**

Apesar da Ciclosporina A ser bastante estudada como inibidor da atividade da Pgp em diversos tecidos, seus efeitos na excreção renal de Ro-123 são motivo de controvérsia. Enquanto alguns autores mostraram que a CSA reduz significativamente a secreção de Ro-123 (TSURUOKA *et al.*, 2001; ROMITI *et al.*, 2002), outros observaram que o *clearance* de Ro-123 não foi influenciado pelo tratamento com CSA, e sugeriram que este corante estava sendo transportado preferencialmente pelo sistema OCT (transportadores de cátions orgânicos) (MASEREEUW *et al.*, 1997).

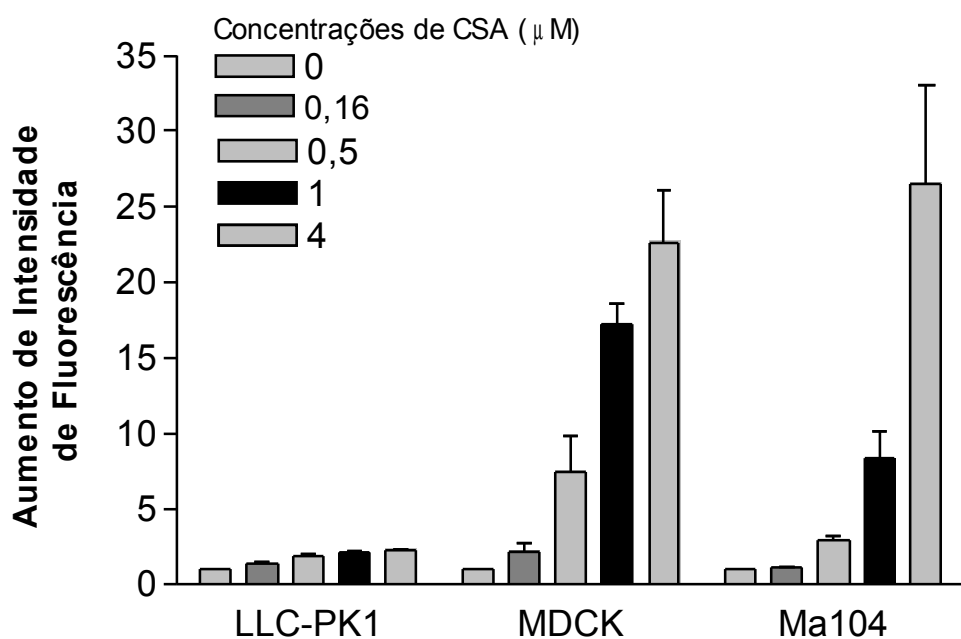
Pelas controvérsias citadas acima, e pelos resultados da figura 10, decidimos testar se concentrações mais baixas que 5  $\mu$ M (não tóxicas) teriam efeito modulador da atividade da Pgp. O ensaio clássico de extrusão de Ro123, no qual o inibidor a ser estudado está presente em todo o tempo do ensaio, foi empregado para as três linhagens do nosso modelo.

A intensidade de fluorescência representa o acúmulo do corante, e o aumento de acúmulo representa uma diminuição da atividade da Pgp. Na figura 11 é possível observar que a CSA aumentou consideravelmente a fluorescência das células MDCK e Ma104, e que este aumento ocorreu de forma concentração-dependente; mas pouco aumentou o acúmulo de Ro-123 nas células LLC-PK1. Isto nos sugere que a CSA tem de fato efeito inibidor da atividade de Pgp nas células renais estudadas. Mas estes resultados se destacam pelo fato de que esta modulação da atividade funcional da Pgp ocorreu em concentrações menores que aquelas com as quais se observou efeito tóxico (ver figura 10).

É possível observar também, que ocorre uma tendência a saturação do efeito modulador da CSA para LLC-PK1 e MDCK, e que isto não acontece para Ma104.



A



B

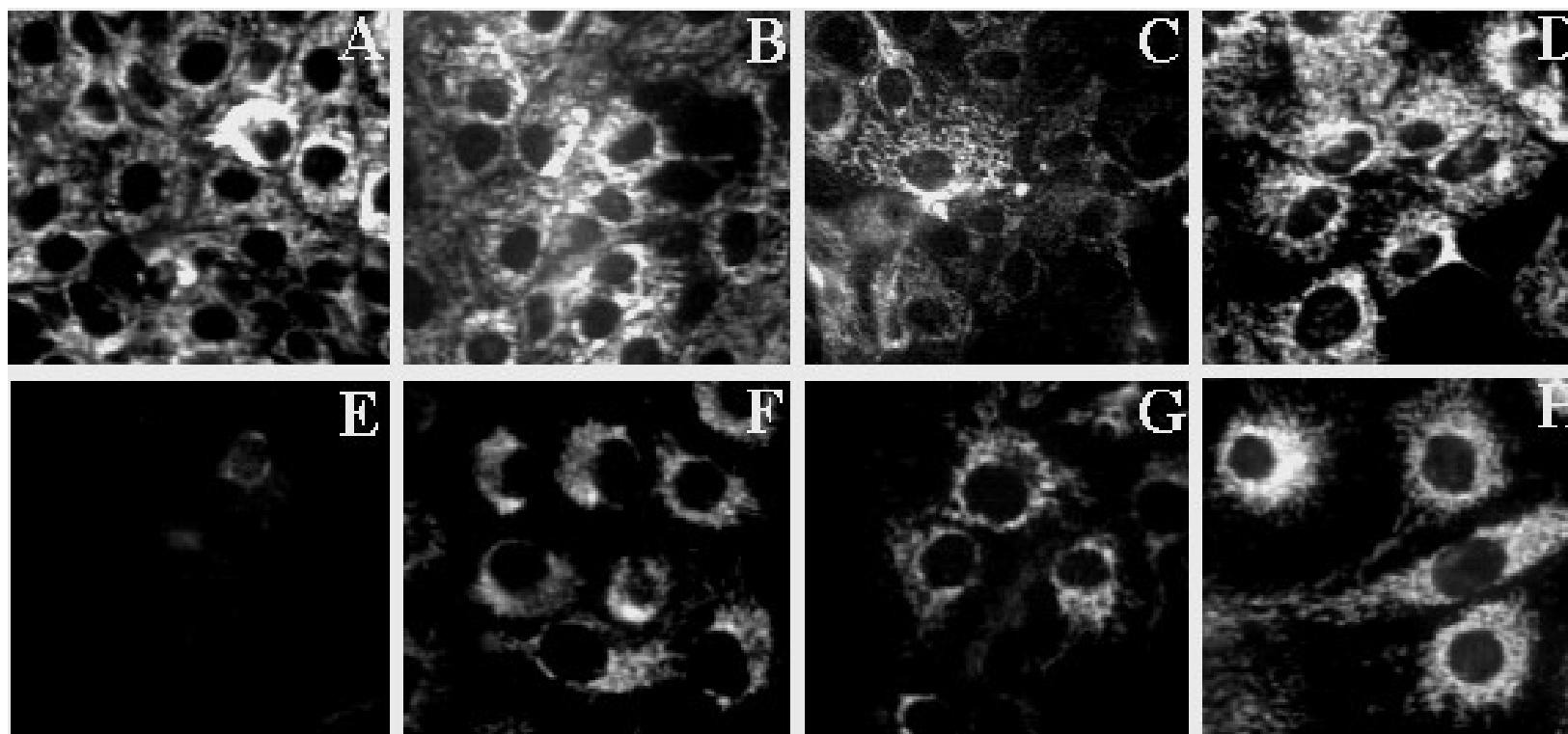
**Figura 11. Efeito da Ciclosporina A no efluxo de Rodamina 123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104.** As células foram incubadas com Ro-123 (400 ng/ml) por 30 min. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS, e incubadas por mais 30 min em meio para extrusão do corante, na presença ou ausência de CSA (0,16; 0,5; 1 e 4 μM) em todo o tempo do ensaio. A fluorescência intracelular foi medida por citometria de fluxo. Em **A** – experimento representativo. No detalhe está apresentado média (razão entre células com e sem CSA) e erro padrão de três experimentos, n=3. Em **B** - média e erro padrão de três experimentos, n=3; no eixo das ordenadas está apresentada a razão da fluorescência de células tratadas com Ro-123 na presença de CSA / a fluorescência de células tratadas com Ro-123 na ausência de CSA, indicando o aumento na intensidade de fluorescência.

#### **4.7 - Efeito da Ciclosporina A no acúmulo e localização de Rodamina 123, nas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104**

Rodamina 123 é um marcador mitocondrial (NEYFAKH, 1988), porém não há dados de distribuição do corante especificamente para as células deste estudo. Além disto, não se tem informação quanto a um possível efeito da CSA nesta localização.

Para abordar estas duas questões foi utilizada a técnica de microscopia de fluorescência. As células foram incubadas por 30 minutos com Ro-123, mais 30 minutos livres do corante para extrusão deste, na presença ou ausência de CSA (4  $\mu$ M).

Foi verificado que o corante acumula nas três linhagens, com localização na mitocôndria, e que na presença de CSA este acúmulo está aumentado para MDCK e Ma104, porém sem alterações de distribuição do corante (figura 12). A linhagem Ma104 incubada apenas com Ro-123 tem uma marcação bastante fraca, por isto, foi necessário utilizar uma concentração mais alta de Ro-123 para estas células, para melhor comparar os tratamentos (Ro-123 e Ro123 + CSA). Estes dados estão em concordância com os dados de citometria de fluxo apresentados na figura 11.



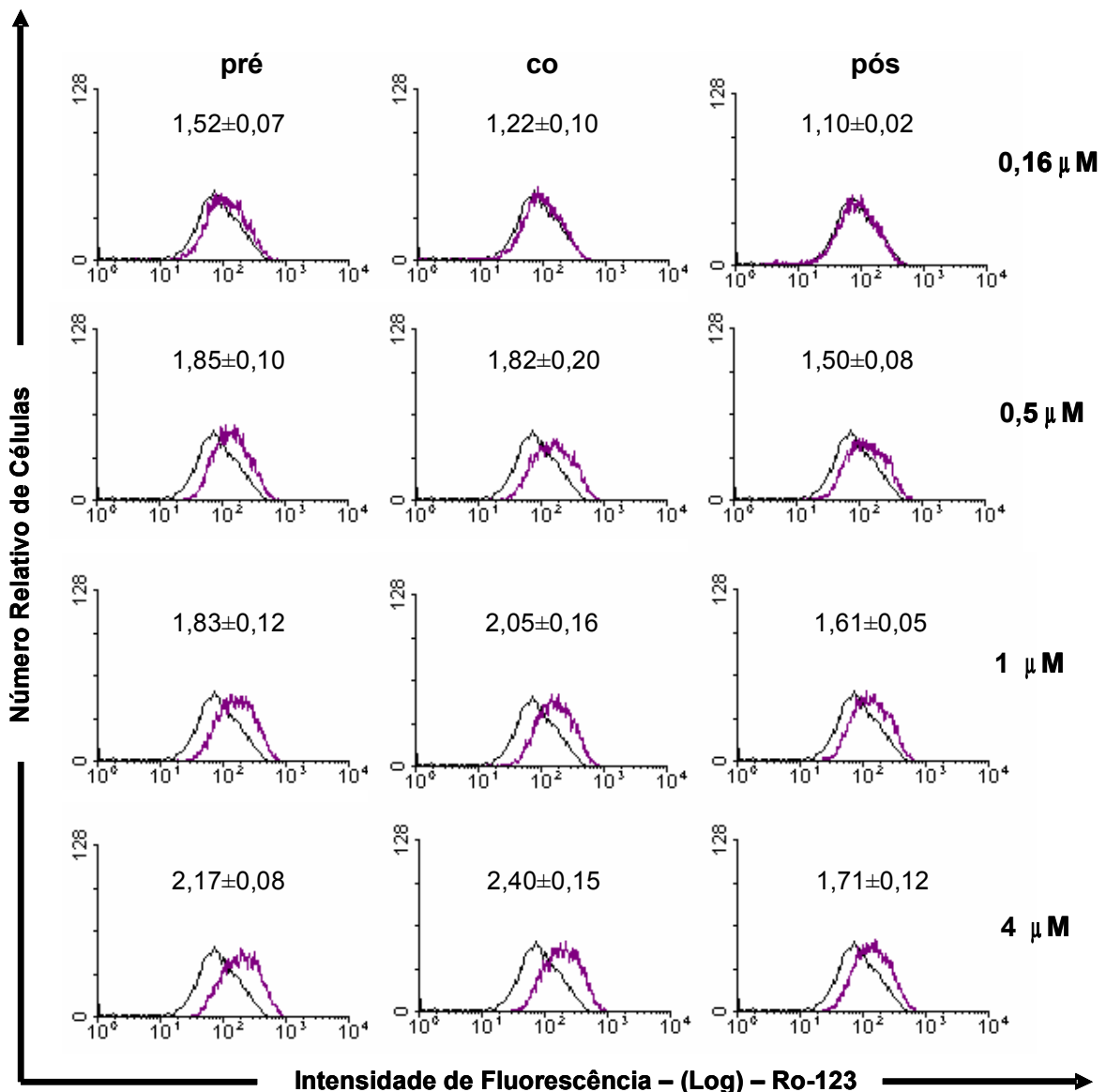
**Figura 12. Efeito da Ciclosporina A no acúmulo e localização de Rodamina 123, nas linhagens LLC-PK1, MDCK e Ma104.** As células foram preparadas em placas de Petri especialmente desenvolvidas para este tipo de microscopia ( $1 \times 10^5$  cels/ml), incubadas com Ro-123 (400 ng/ml) por 30 min na presença ou ausência de CSA ( $4 \mu\text{M}$ ). Após a retirada do corante as células foram incubadas por mais 30 min na presença ou ausência de CSA na mesma concentração. Para Ma104 o mesmo experimento foi repetido com Ro-123 ( $1,2 \mu\text{g/ml}$ ). **A, C, E, G** – Ro-123; **B, D, F, H** – Ro-123 + CSA. **A, B** – LLC-PK1; **C, D** – MDCK; **E, F** – Ma104; **G, H** – Ma104 Ro-123 ( $1,2 \mu\text{g/ml}$ ). Microscópio Axiovert 100 / epifluorescência (Zeiss, Alemanha), observado em uma lente objetiva de imersão com ganho de 40X.

#### **4.8 - Efeito da Ciclosporina A, em diferentes momentos de incubação, no efluxo de Ro-123 pela linhagem LLC-PK1**

Uma segunda controvérsia aparece entre os estudos que investigam os mecanismos pelos quais a CSA inibe a atividade de proteínas MDR. He & Liu em 2002 mostraram que a CSA inibe a atividade ATPásica da Pgp, na presença ou ausência de um substrato (atividade basal). Em contraste, Saeki e seus colaboradores, em 1992, mostraram que a CSA é transportada pela Pgp.

Então, neste estudo foi desenvolvida uma dinâmica de incubação que fornece mais informações sobre os efeitos moduladores da CSA nas três linhagens: (1) pré-incubação - as células foram incubadas com CSA por 30 minutos antes da incubação com Ro-123; (2) co-incubação - as células foram incubadas com CSA e Ro-123 por 30 minutos; (3) pós-incubação - as células foram incubadas com CSA por 30 minutos depois da incubação com Ro-123.

O tratamento com 0,16  $\mu\text{M}$  de CSA antes, durante e depois da incubação com Ro-123 levou a um pequeno aumento de acúmulo deste corante. Comparando este efeito com o efeito da CSA em todo o tempo do ensaio (figura 11) não observamos diferenças entre os valores. Este efeito ocorreu a partir da concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de CSA, com mínimas diferenças entre as concentrações e entre os tratamentos dentro de cada concentração (figura 13).

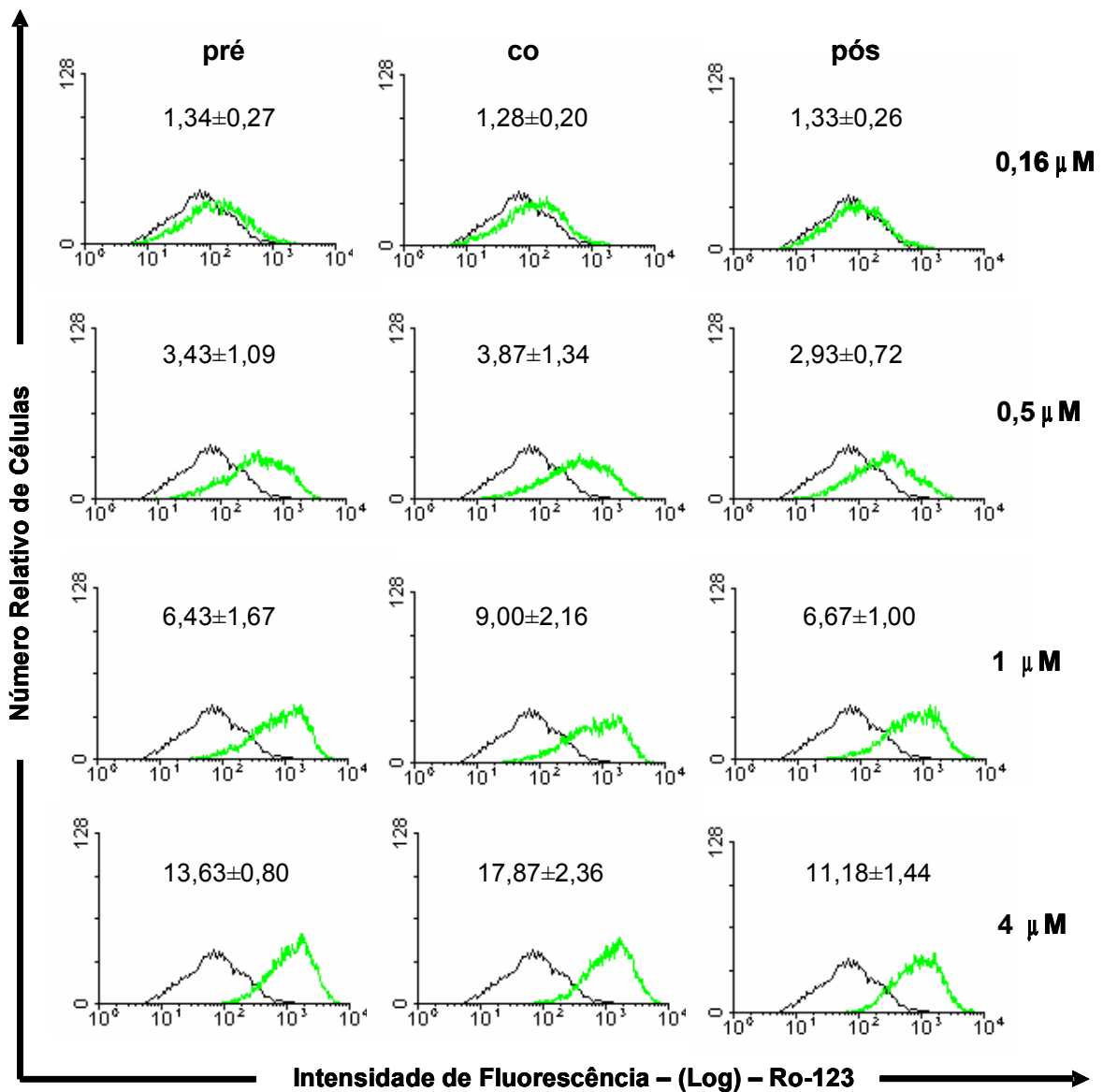


**Figura 13. Efeito da Ciclosporina A, em diferentes momentos de incubação, no efluxo de Rodamina 123 pela linhagem LLC-PK1.** As células foram preparadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^5$  cels/ml), incubadas com Ro-123 (400 ng/ml) por 30 min. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS, e incubadas por mais 30 min em meio para extrusão do corante. A CSA (0,16; 0,5; 1 e 4  $\mu$ M) foi adicionada em três momentos em relação a incubação com Ro-123 (por 30 min): antes da incubação com Ro-123 (pré-incubação), durante a incubação com Ro-123 (co-incubação), e depois da incubação com Ro-123 (pós-incubação). As células foram então lavadas com PBS, retiradas da placa com tripsina-EDTA, e a fluorescência intracelular medida por citometria de fluxo. Preto – células incubadas com Ro-123; violeta – células incubadas com Ro-123 na presença de CSA. Experimento representativo. No detalhe está apresentado média e erro padrão de três experimentos,  $n=3$ . Estes valores foram obtidos pela razão da fluorescência de células tratadas com Ro-123 na presença de CSA / a fluorescência de células tratadas com Ro-123 na ausência de CSA, indicando o aumento na intensidade de fluorescência.



#### **4.9 - Efeito da Ciclosporina A, em diferentes momentos de incubação, no efluxo de Ro-123 pela linhagem MDCK**

Para as células MDCK os tratamentos com CSA antes, durante e depois da incubação com Ro123 resultaram em uma modulação semelhante, tendo a co-incubação o maior efeito. A modulação ocorreu de forma concentração-dependente, com o efeito iniciando em 0,5  $\mu\text{M}$  (figura 14). Comparando este efeito com o efeito da CSA em todo o tempo do ensaio (figura 11) observamos que o efeito da CSA nestes tratamentos é menor para todas as concentrações.



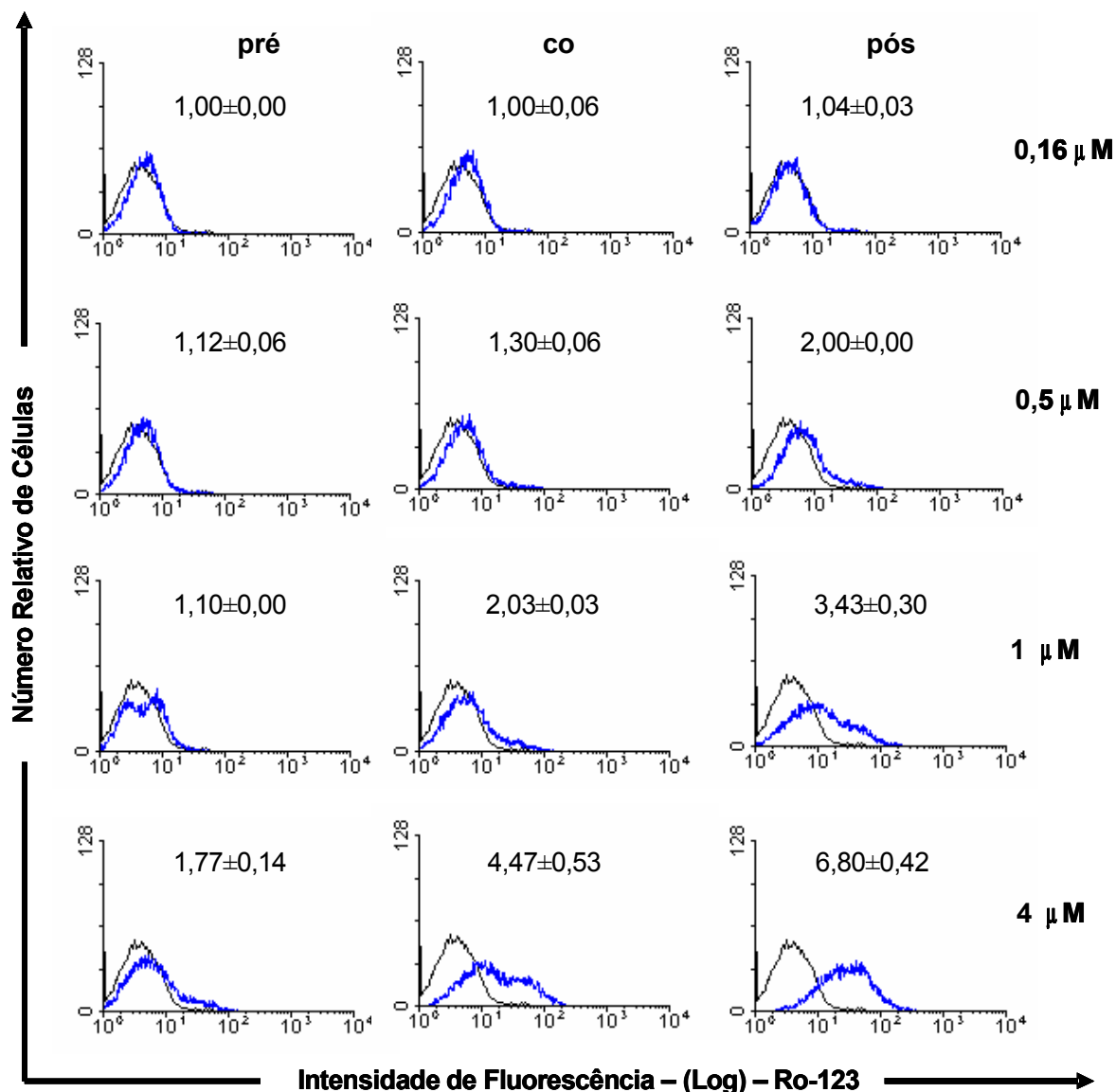
**Figura 14. Efeito da Ciclosporina A, em diferentes momentos de incubação, no efluxo de Rodamina 123 pela linhagem MDCK.** As células foram preparadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^5$  cels/ml), incubadas com Ro-123 (400 ng/ml) por 30 min. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS, e incubadas por mais 30 min em meio para extrusão do corante. A CSA (0,16; 0,5; 1 e 4  $\mu$ M) foi adicionada em três momentos em relação a incubação com Ro-123 (por 30 min): antes da incubação com Ro-123 (pré-incubação), durante a incubação com Ro-123 (co-incubação), e depois da incubação com Ro-123 (pós-incubação). As células foram então lavadas com PBS, retiradas da placa com tripsina-EDTA, e a fluorescência intracelular medida por citometria de fluxo. Preto – células incubadas com Ro-123; verde – células incubadas com Ro-123 na presença de CSA. Experimento representativo. No detalhe está apresentado média e erro padrão de três experimentos,  $n=3$ . Estes valores foram obtidos pela razão da fluorescência de células tratadas com Ro-123 na presença de CSA / a fluorescência de células tratadas com Ro-123 na ausência de CSA, indicando o aumento na intensidade de fluorescência.

#### **4.10 - Efeito da Ciclosporina A, em diferentes momentos de incubação, no efluxo de Ro-123 pela linhagem Ma104**

O acúmulo de Ro-123 pelas células Ma104 foi pouco alterado pela pré-incubação com CSA, mesmo para a maior concentração (4  $\mu\text{M}$ ). A pós-incubação foi mais efetiva em reter a Ro-123 dentro destas células do que a co-incubação. A modulação ocorreu de forma concentração-dependente, não tendo efeito a menor concentração (figura 15). Comparando este efeito com o efeito da CSA em todo o tempo do ensaio (figura 11) observamos que o efeito da CSA nestes tratamentos é muito menor para todas as concentrações.

Há uma clara diferença entre o padrão de efeito da CSA nas linhagens Ma104 e MDCK. Para a Ma104 é importante a presença do inibidor, o que está coerente com um mecanismo de inibição competitiva; o que não ocorre com a MDCK, que se mostrou mais sensível ao efeito modulador, que permanece mesmo após a retirada da CSA (pré-incubação).

A linhagem MDCK acumula mais corante do que a linhagem Ma104 (ver figura 6), portanto, havia a possibilidade de que a concentração de Ro-123 utilizada estivesse alta para a capacidade de transporte destas células, o que poderia influenciar os últimos resultados. Então, o ensaio da figura 9 foi repetido utilizando Ro-123 nas concentrações de 50 e 100 ng/ml. Nesta situação o acúmulo do corante foi muito menor, mas o padrão de efeito da CSA nos três tempos de incubação se manteve (dados não mostrados).



**Figura 15. Efeito da Ciclosporina A, em diferentes momentos de incubação, no efluxo de Rodamina 123 pela linhagem Ma104.** As células foram preparadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^5$  cels/ml), incubadas com Ro-123 (400 ng/ml) por 30 min. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS, e incubadas por mais 30 min em meio para extrusão do corante. A CSA (0,16; 0,5; 1 e 4  $\mu$ M) foi adicionada em três momentos em relação a incubação com Ro-123 (por 30 min): antes da incubação com Ro-123 (pré-incubação), durante a incubação com Ro-123 (co-incubação), e depois da incubação com Ro-123 (pós-incubação). As células foram então lavadas com PBS, retiradas da placa com tripsina-EDTA, e a fluorescência intracelular medida por citometria de fluxo. Preto – células incubadas com Ro-123; violeta – células incubadas com Ro-123 na presença de CSA. Experimento representativo. No detalhe está apresentado média e erro padrão de três experimentos,  $n=3$ . Estes valores foram obtidos pela razão da fluorescência de células tratadas com Ro-123 na presença de CSA / a fluorescência de células tratadas com Ro-123 na ausência de CSA, indicando o aumento na intensidade de fluorescência.

## **5. *Discussão***

---

Este estudo analisou os efeitos citotóxico e modulador da CSA em três linhagens epiteliais renais que diferem na expressão constitutiva de Pgp.

### **5.1 – As linhagens LLC-PK1, MDCK, Ma104 e a atividade funcional da glicoproteína-P**

Utilizando medidas de acúmulo do substrato Ro-123, observamos que as três linhagens acumularam o corante, após extrusão, de uma forma proporcional à expressão de Pgp: LLC-PK1 apresentou os maiores acúmulos, MDCK apresentou acúmulos menores que a primeira linhagem, e Ma104 (CAPELLA *et al.*, 1999) teve os menores acúmulos quando comparado com as duas primeiras linhagens (ver figura 6).

Porém, neste ponto do nosso trabalho existia uma questão importante. Considerando que a Ro-123 tem como alvo a mitocôndria (CHEN *et al.*, 1982), diferenças de massa mitocondrial poderiam influenciar os resultados de acúmulo deste corante. A linhagem Ma104, que apresentou o menor acúmulo de Ro-123, poderia ter a menor massa mitocondrial, e o acúmulo observado poderia ser por isto e não pela grande atividade da Pgp, como sugerido por nós inicialmente. Para resolver esta questão utilizamos o corante MTG (HAUGLAND, 2002) - que se acumula na mitocôndria independente do potencial de membrana mitocondrial - para medir a massa mitocondrial de cada linhagem. Tivemos como resultado valores de acúmulo de MTG aproximados para LLC-PK1 e Ma104, e um maior acúmulo para MDCK (ver figura 8). Portanto, a grande diferença de acúmulo (inicial e após extrusão) de Ro-123

entre LLC-PK1 e Ma104 não poderia ser explicada por diferenças de massa mitocondrial.

Concluimos então, que a diferença de atividade de Pgp entre as linhagens possibilitaria estudar os efeitos citotóxico e modulador da CSA avaliando possíveis diferenças de sensibilidade e resistência a estes efeitos. Além disto, estas células, têm a característica de expressão constitutiva da proteína, o que torna desnecessária a manipulação por exemplo, com transfecção do gene *MDR1*.

## **5.2 – O efeito citotóxico da Ciclosporina A**

Para avaliar o efeito citotóxico da CSA e observar possíveis diferenças na sensibilidade das linhagens estudadas a esta droga, utilizamos um método colorimétrico de medida de viabilidade celular. Esta avaliação demonstrou que as concentrações de CSA de 0,1 e 1  $\mu\text{M}$  têm um efeito apenas discreto sobre a viabilidade celular das três linhagens, sem diferenças de sensibilidade entre as mesmas, e que concentrações mais altas – 5 e 10  $\mu\text{M}$  – têm um efeito mais importante de redução de viabilidade para as três linhagens, com pequenas diferenças de sensibilidade entre as linhagens (ver figura 10).

Os efeitos citotóxicos da CSA foram estudados anteriormente por outros grupos que concluíram que a CSA tem um efeito citotóxico direto em algumas células. Em alguns destes estudos as linhagens eram as mesmas do nosso estudo; e foi observado um efeito citotóxico importante, concentração-dependente (BECKER *et al.*, 1987). Porém, estes estudos utilizaram

concentrações altas, que começavam em 10  $\mu\text{M}$ . E um aspecto fundamental dos métodos utilizados em nosso estudo foi a faixa de concentrações escolhida para os ensaios – de 0,1 até 50  $\mu\text{M}$ . Desta forma foi possível observar os efeitos da CSA em concentrações que estão na faixa de concentrações plasmáticas (0,1-1  $\mu\text{M}$ ) (KOVARIK *et al*, 1994), e em concentrações que podem ser alcançadas no rim (até oito vezes a maior concentração plasmática) (LENSMEYER *et al*, 1991), e ainda em concentrações acima destas, que são consideradas supra-terapêuticas (10-50  $\mu\text{M}$ ).

Podemos concluir então, baseado na figura 10, que nas concentrações relevantes para a terapêutica, a CSA não apresenta efeito citotóxico direto (para as células estudadas e nas condições estudadas).

É preciso considerar que linhagens celulares são mais resistentes aos efeitos citotóxicos de drogas, por serem, muitas vezes, imortalizadas. Porém, um estudo realizado com células de túbulo proximal de humanos mostrou resultados de viabilidade semelhantes aos nossos, após tratamento com CSA. Neste estudo a maior concentração utilizada foi 10  $\mu\text{g/ml}$  (aproximadamente 8  $\mu\text{M}$ ) e a viabilidade foi próxima de 85% em relação ao controle (100%) (JOHNSON *et al.*, 1999 ).

Para as duas maiores concentrações por nós utilizadas (25 e 50  $\mu\text{M}$ ), o efeito citotóxico ou antiproliferativo foi bastante grande. Isto ocorreu de forma inversamente proporcional à expressão de Pgp (ver figura 9), sugerindo o transporte de CSA por esta proteína.

Diversos estudos têm demonstrado que drogas imunossupressoras como a CSA e o FK506 são substratos da Pgp, e que células resistentes



(MDR) acumulam menos CSA em comparação com as células sensíveis (não MDR) (TAMAI & SAFA, 1990; SAEKI *et al.*, 1992). Nossos resultados estão de acordo com estas afirmativas, pois demonstraram que a alta expressão de Pgp das células Ma104 representou um fator de proteção contra o efeito citotóxico da CSA.

Em um trabalho, *in vitro*, com a linhagem MDCK (DEL MORAL *et al.*, 1995), e em outro trabalho, *in vivo*, com túbulo proximal de rato (DEL MORAL *et al.*, 1997), foi demonstrado que o tratamento prolongado com CSA induz um aumento na expressão da Pgp. Então foi formulada a hipótese de que em células normais, uma exposição prolongada a um agente tóxico, assim como a CSA, induz a expressão de Pgp como um mecanismo de detoxificação.

Em 1998, Hauser e colaboradores sugeriram que a variação de sensibilidade individual de pacientes aos efeitos terapêuticos e tóxicos da CSA e do FK506 poderia depender dos níveis basais de Pgp (em linfócitos e células renais, respectivamente) e da sensibilidade dos indivíduos à indução de expressão desta proteína por estes agentes.

Portanto, nos trabalhos citados acima, o aumento de expressão da Pgp deveria proteger as células renais dos efeitos tóxicos de drogas imunossupressoras. Isto ocorreria através de uma eliminação mais eficiente das drogas, evitando o acúmulo das mesmas nas células. Estudos mostrando que a eliminação de CSA está diminuída em camundongos *mdr1a* (-/-) davam base a esta hipótese (SCHINKEL *et al.*, 1995). O fato de que pacientes sem indução da expressão de Pgp têm a maior incidência de nefrotoxicidade induzida por CSA, enquanto há um pequeno número de casos em pacientes

com alta expressão da proteína, reforça ainda mais esta hipótese (DEL MORAL *et al.*, 1995).

### **5.3 – O efeito modulador da Ciclosporina A**

A Pgp tem uma grande lista de substratos exógenos potencialmente tóxicos. Estudos vêm mostrando que a CSA é um potente inibidor da Pgp (TWENTYMAN, 1992). Além disto foi proposto que em células tubulares, a inibição da Pgp pode levar ao acúmulo de prenilesteína metil ésteres, altamente citotóxicos, que são produzidos durante o metabolismo de *ras* e outras proteínas G (ZHANG *et al.*, 1995). Estes dados nos sugeriram um possível envolvimento da inibição da atividade desta proteína no processo de nefrotoxicidade induzido por CSA.

Como relatamos anteriormente, as concentrações de 0,1-5  $\mu\text{M}$  de CSA tiveram um pequeno efeito sobre a viabilidade celular das três linhagens deste estudo. Decidimos então testar se estas concentrações, que estão dentro da faixa de relevância para concentrações plasmáticas e da concentração que pode ser alcançada no rim (quando a CSA é administrada ao paciente), mas não têm efeito citotóxico direto, teriam efeito sobre a atividade da Pgp.

Observamos que, na presença de CSA (0,16 , 0,5 , 1 e 4  $\mu\text{M}$ ), as linhagens MDCK e Ma104 tiveram um aumento considerável no acúmulo do substrato Ro-123, e que este aumento ocorreu de forma concentração-dependente. E um pequeno aumento no acúmulo de Ro-123 para as células LLC-PK1 (figura 11). A Ro-123 na concentração utilizada não é tóxica para as

células, mas podemos sugerir que se este aumento de acúmulo ocorresse com um substrato da Pgp potencialmente tóxico o resultado seria a morte celular. Isto nos sugeriu que a CSA tem um efeito inibidor da atividade da Pgp nas células renais estudadas, em concentrações que pouco alteraram a viabilidade das mesmas. Além disto, comparando as linhagens MDCK e Ma104, verificamos que a linhagem Ma104 foi mais resistente ao efeito inibitório da CSA (ver figura 10).

A partir dos dados das figuras 10 e 11 foi possível considerar que a inibição da atividade da Pgp poderia, ao menos em parte, contribuir para a nefrotoxicidade induzida pela CSA. A inibição desta proteína poderia resultar no acúmulo de substratos tóxicos, e o aumento da expressão da Pgp induzido pela CSA poderia ser um fator de proteção para este efeito modulador.

Quando sugerimos o envolvimento da Pgp com a nefrotoxicidade, podemos citar um estudo que indiretamente apóia esta sugestão. Outro agente imunossupressor, Sirolimus (Rapamicina), não é capaz de inibir a atividade da Pgp em concentrações plasmáticas, e não é uma droga nefrotóxica (BAI *et al.*, 2004). Além disto, o imunossupressor FK506, que é nefrotóxico, é capaz de inibir a atividade da Pgp em concentrações plasmáticas (NAITO *et al.*, 1992).

A Ro-123 além de ser um substrato da Pgp também é um substrato do sistema OCT, e a CSA não é capaz de inibir a atividade deste transportador. Uma questão de grande controvérsia na literatura é a importância de cada transportador para o transporte deste cátion no rim. Enquanto alguns autores mostraram que a CSA, quando administrada *in vivo* em ratos, diminui a depuração de Ro-123, sugerindo um papel importante da Pgp neste processo

(HUANG *et al.*, 2000), outros autores, utilizando túbulos isolados, observaram que a CSA não altera a secreção de Ro-123, e atribuíram a outras proteínas do sistema OCT a função de secreção desta substância (MASEREEUW *et al.*, 1997).

Nosso estudo mostrou, para as células MDCK e Ma104, que o tratamento com CSA promove um grande aumento de acúmulo de Ro-123 (figura 11). Além disto, observamos um pequeno efluxo de Ro-123 pela linhagem LLC-PK1 (ver figura 6), que foi inibido pelo tratamento com CSA (ver figura 10); então apesar desta linhagem expressar proteínas do sistema OCT e de ter sido sugerido que estas células transportam Ro-123 via OCT (VAN DER SANDT *et al.*, 2000), nós não estudamos a participação deste transporte em nossos experimentos, pois o estudo deste sistema não fazia parte de nossos objetivos. Assim, podemos apenas considerar como uma explicação para tanta controvérsia que, *in vivo*, quando a Pgp está inibida, deve ocorrer uma regulação da expressão ou atividade de outras proteínas do sistema OCT, o que poderia ser suficiente para a depuração normal de um substrato. Sendo que isto poderia ocorrer após um aumento da concentração intracelular do substrato, o que resultaria em danos diretos as células tubulares.

Outra questão que é motivo freqüente de controvérsia na literatura é o mecanismo pelo qual os inibidores da Pgp exercem esta função. Em 2000 Seelig e Landwojtowicz sugeriram que o mecanismo pelo qual a CSA inibe a atividade da Pgp é inibição competitiva. E tem sido sugerido também que esta competição poderia ser pelo sítio de transporte, pois segundo alguns autores a CSA também é um substrato da Pgp (SAEKI *et al.*, 1992). Porém, He e Liu em

2002, relataram que a CSA inibe a atividade ATPásica da Pgp, tanto a basal quanto a estimulada por substratos.

Nós observamos que a CSA foi capaz de induzir um aumento de acúmulo de Ro-123 para as células estudadas, mas quando alteramos os períodos de incubação com a CSA obtivemos informações adicionais. Para Ma104 a pré-incubação com CSA não teve efeito, e a pós-incubação foi o tratamento que provocou o maior efeito. Com estes resultados ficou evidente a importância da presença da CSA para o surgimento do efeito considerado, um padrão compatível com um mecanismo de inibição competitiva. Para MDCK e LLC-PK1, os três tratamentos apresentaram efeito com poucas diferenças entre eles. Isto sugere que para estas células o efeito modulador da CSA não é reversível pela retirada da mesma. Neste caso podemos supor que como estas células têm menor atividade da Pgp, em comparação com a linhagem Ma104, o acúmulo de CSA seria maior, levando a uma inibição mesmo quando a CSA já não está mais no meio.

#### **5.4 – Considerações finais**

Muitos estudos vêm mostrando que a perda de um órgão transplantado em longo prazo é causada por fatores imunológicos e não imunológicos; sendo as duas principais causas os episódios de rejeição recorrente e a toxicidade associada a CSA.

Em um trabalho de 2001, Koziolk e seus colaboradores encontraram células mononucleares infiltrando o tecido renal transplantado com forte

expressão de Pgp, em ambos os casos, de rejeição aguda celular e vascular. Este grupo observou também que a intensidade da expressão de Pgp era proporcional à severidade da rejeição. Além disto, foi observado que células mononucleares de sangue periférico tratadas com CSA *in vitro*, apresentam aumento de expressão de Pgp.

De acordo com um estudo de Singh e colaboradores, diferentes padrões de expressão de Pgp em linfócitos podem contribuir para reações de rejeição. Isto ocorreria por resistência a CSA, linfócitos T CD4<sup>+</sup> transportando CSA via Pgp (SINGH *et al.*, 2004).

Nosso estudo, em conjunto com as hipóteses citadas nesta discussão, considera um envolvimento da Pgp em episódios de rejeição e na toxicidade associada a CSA. Nosso estudo contribui mostrando que em células renais a CSA tem um efeito citotóxico apenas quando em concentrações supra-terapêuticas, mas tem um efeito modulador da atividade da Pgp em concentrações que são normalmente alcançadas no plasma e rim quando este fármaco é administrado ao paciente. Sugerimos então que no túbulo proximal a CSA pode inibir a atividade da proteína resultando em um acúmulo de substratos causando desta forma uma toxicidade. Mostramos também que a alta atividade da Pgp das células Ma104 representou um fator de proteção contra os efeitos citotóxicos da CSA, e também uma resistência ao efeito modulador. Isto em células renais pode ser desejável para evitar a nefrotoxicidade, mas em linfócitos pode levar ao transporte da CSA para fora da célula e resistência ao efeito imunossupressor.

Esta proteína por ter um número grande de substratos, inclusive outros agentes imunossupressores, pode estar envolvida na nefrotoxicidade associada a outros fármacos.

O fato da Pgp estar expressa na membrana apical do túbulo proximal e de ter como um possível papel fisiológico o transporte transepitelial no sistema transportador de cátions orgânicos têm grande importância. Isto porque a inibição da atividade da proteína pode resultar em acúmulo de substâncias potencialmente tóxicas, e por outro lado o aumento de atividade da proteína pode ser útil para prevenir e tratar condições onde é necessário estimular a eliminação de uma determinada substância.

A Pgp também está expressa em segmentos do néfron que não estão diretamente envolvidos com a excreção de xenobióticos, como a porção ascendente da alça de Henle e o ducto coletor; e neste caso a Pgp pode estar transportando metabólitos endógenos produzidos por estas células, ou prevenindo a entrada de substâncias do lúmen. Porém, o interessante é que determinadas drogas, por exemplo, diuréticos catiônicos, se ligam a proteínas plasmáticas e atingem o lúmen via transportadores no túbulo proximal. Além disto, outras substâncias, como hormônios, têm como alvo segmentos do néfron, e atingem o lúmen antes de acessar estes alvos, portanto precisam de transportadores de membrana para o transporte transepitelial, e podem ter sua ação modulada pela atividade deles. Se a Pgp participa deste processo de transporte ainda não se sabe, mas certamente é uma questão de extrema relevância para o entendimento desta proteína na fisiologia normal do tecido.

## **6. Conclusões**

---



A partir de nossos resultados podemos concluir que:

- O acúmulo de Ro-123 pelas linhagens LLC-PK1, MDCK, e Ma104 é proporcional à expressão de Pgp relatada na literatura. Estas células formam um modelo de baixa atividade de Pgp, LLC-PK1, média atividade, MDCK, e alta atividade, Ma104.
- A CSA nas concentrações de 0,1 até 5  $\mu\text{M}$  (concentrações relevantes para terapêutica) não apresenta efeito citotóxico direto para as células estudadas.
- A CSA nas concentrações mais altas (10-50  $\mu\text{M}$ , concentrações supra-terapêuticas) tem grande efeito citotóxico ou antiproliferativo, de forma inversamente proporcional a expressão de Pgp.
- Concentrações não tóxicas de CSA (0,16-4  $\mu\text{M}$ ) são capazes de aumentar consideravelmente o acúmulo de Ro-123 (inibir a atividade da Pgp) nas linhagens MDCK e Ma104, de forma dependente da concentração.
- Para as linhagens LLC-PK1 e MDCK o efeito modulador da CSA sobre a atividade da Pgp não é revertido com a retirada da mesma. Para Ma104, o efeito depende da presença da CSA no meio, o que indica um padrão compatível com um mecanismo de inibição competitiva.

## ***7. Referências Bibliográficas***

---

ALTENBERG, G.A., VANOYE, C.G., HORTON, J.K., REUSS, L. Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 91, n. 11, p4654-p4657, 1994.

BACH, J.F. The contribution of cyclosporine A to the understanding and treatment of autoimmune diseases. **Transplant Proc.** v. 31, n. 1-2A, p16S-p18S, 1999.

BAI, S., STEPKOWSKI, S.M., KAHAN, B.D., BRUNNER, L.J. Metabolic interaction between cyclosporine and sirolimus. **Transplantation.** v. 77, n. 10, p1507-p1512, 2004.

BECKER, G.M., GANDOLFI, A.J., NAGLE, R.B. Effects of cyclosporin A on a kidney epithelial cell line (LLC-PK1). **Res Commun Chem Pathol Pharmacol.** v. 56, n. 2, p277-p280, 1987.

BELLAMY, W.T. P-glycoproteins and multidrug resistance. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** v. 36, p161-p183, 1996.

BENNETT, W.M., PULLIAM, J.P. Cyclosporine nephrotoxicity. **Ann Intern Med.** v. 99, n. 6, p851-p854, 1983.

BERKHIN, E.B., HUMPHREYS, M.H. Regulation of renal tubular secretion of organic compounds. **Kidney Int.** v. 59, n. 1, p17-p30, 2001.

BOREL, J.F., FEURER, C., GUBLER, H.U., STAHELIN, H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. **Agents Actions.** v. 6, n. 4, p468-p475, 1976.

BOREL, J.F., FEURER, C., MAGNÉE, C., STAHELIN, H. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. **Immunology**. v. 32, p1017-p1025, 1977.

BOREL, J.F., KIS, Z.L. The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune). **Transplant Proc**. v. 23, n. 2, p1867-p1874, 1991.

CAPELLA, L.S, GEFE, M., SILVA, E.F., MORALES, M.M., AFFONSO-MITIDIERI, O., LOPES, A.G., RUMJANEK, V.M., CAPELLA, M.A. Reduced glutathione protect cells from ouabain toxicity. **Biochim Biophys Acta**. v. 1526, n. 3, p293-p300, 2001.

CAPELLA, M.A., ORIND, M., MORALES, M.M., RUMJANEK, V.M., LOPES, A.G. Expression of functionally P-glycoprotein in MA104 kidney cells. **Z Naturforsch [C]**. v. 54, n. 1-2, p119-p127, 1999.

CHAUDHARY, P.M., RONINSON, I.B. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. **Cell**. v. 66, n. 1, p85-p94, 1991.

CHEN, L.B, SUMMERHAYES, I.C., JOHNSON, L.V., WALSH, M.L., BERNAL, S.D., LAMPIDIS, T.J. Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**. v. 46, n. 1, p141-p155, 1982.

CHIN, K.V., TANAKA, S., DARLINGTON, G., PASTAN, I., GOTTESMAN, M.M. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. **J Biol Chem**. v. 265, n. 1, p221-p226, 1990.

CORDON-CARDO, C., O'BRIEN, J.P., BOCCIA, J., CASALS, D., BERTINO, J.R., MELAMED, M.R. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. **J Histochem Cytochem.** v. 38, n. 9, p1277-p1287, 1990.

DAI, Y., IWANAGA, K., LIN, Y.S., HEBERT, M.F., DAVIS, C.L., HUANG, W., KHARASCH, E.D., THUMMEL, K.E. In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. **Biochem Pharmacol.** v. 68, n. 9, p1889-p1902, 2004.

DECORTI, G., ROSATI, A., CANDUSSIO, L., GIRALDI, T., BARTOLI KLUGMANN, F. Characterization of multidrug transporters in a normal renal tubular cell line resistant to doxorubicin. Multidrug transporters in the LLC-PK(1) cell line and its resistant counterpart. **Biochem Pharmacol.** v. 61, n. 1, p61-p66, 2001.

DEL MORAL, R.G., O'VALLE, F., ANDUJAR, M., AGUILAR, M., LUCENA, M.A., LOPEZ-HIDALGO, J., RAMIREZ, C., MEDINA-CANO, M.T., AGUILAR, D., GOMEZ-MORALES, M. Relationship between P-glycoprotein expression and cyclosporin A in kidney. An immunohistological and cell culture study. **Am J Pathol.** v. 146, n. 2, p398-p408, 1995.

DEL MORAL, R.G., ANDUJAR, M., RAMIREZ, C., GOMEZ-MORALES, M., MASSEROLI, M., AGUILAR, M., OLMO, A., ARREBOLA, F., GUILLEN, M., GARCIA-CHICANO, M.J., NOGALES, F.F., O'VALLE, F. Chronic cyclosporin A nephrotoxicity, P-glycoprotein overexpression, and relationships with intrarenal angiotensin II deposits. **Am J Pathol.** v. 151, n. 6, p1705-p1714, 1997.

DE MEIS, L. Fast efflux of Ca<sup>2+</sup> mediated by the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase. **J Biol Chem.** v. 266, n. 9, p5736-p5742, 1991.

DI PIETRO, A., DAYAN, G., CONSEIL, G., STEINFELS, E., KRELL, T., TROMPIER, D., BAUBICHON-CORTAY, H., JAULT, J. P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. **Braz J Med Biol Res.** v. 32, n. 8, p925-p939, 1999.

DREYFUSS, M., HAERRI, E., HOFMANN, H., KOBEL, H., PACHE W., TSCHERTER, H. Cyclosporin A and C. **Europ J appl Microbiol.** v. 3, p125-p133, 1976.

ELZINGA, L.W., ROSEN, S., BENNETT, W.M. Dissociation of glomerular filtration rate from tubulointerstitial fibrosis in experimental chronic cyclosporine nephropathy: role of sodium intake. **J Am Soc Nephrol.** v. 4, n. 2, p214-p221, 1993.

ENDICOTT, J.A., LING, V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. **Annu Rev Biochem.** v. 58, p137-p171, 1989.

GOH, L.B., SPEARS, K.J., YAO, D., AYRTON, A., MORGAN, P., ROLAND WOLF, C., FRIEDBERG, T. Endogenous drug transporters *in vitro* and *in vivo* models for the prediction of drug disposition in man. **Biochem Pharmacol.** v. 64, n. 11, p1569-p1578, 2002.

GOTTESMAN, M.M., PASTAN, I., AMBUDKAR, S.V. P-glycoprotein and multidrug resistance. **Curr Opin Genet Dev.** v. 6, n. 5, p610-p617, 1996.

HANDSCHUMACHER, R.E., HARDING, M.W., RICE, J., DRUGGE, R.J., SPEICHER, D.W. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. **Science**. v. 226, n. 4674, p544-p547, 1984.

HAUGLAND, R.P. Handbook of fluorescence probes and research products. **Molecular Probes**, Inc., Eugene, Or. 2002.

HAUSER, I.A., KOZIOLEK, M., HOPFER, U., THEVENOD, F. Therapeutic concentrations of cyclosporine A, but not FK506, increase P-glycoprotein expression in endothelial and renal tubule cells. **Kidney Int**. v. 54, n. 4, p1139-p1149, 1998.

HE, L., LIU, G.Q. Interaction of multidrug resistance reversal agents with P-glycoprotein ATPase activity on blood-brain barrier. **Acta Pharmacol Sin**. v. 23, n. 5, p423-p429, 2002.

HEUSLER, K., PLETSCBER, A. The controversial early history of cyclosporine. **Swiss med wkly**. v. 131, p299-p302, 2001.

HIGGINS, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annu Rev Cell Biol**. 8:67-113, 1992.

HIGGINS, C.F., GOTTESMAN, M.M. Is the multidrug transporter a flippase? **Trends Biochem Sci**. v. 17, n. 1, p18-p21, 1992.

HUANG, Z.H., MURAKAMI, T., OKOCHI, A., YUMOTO, R., NAGAI, J., TAKANO, M. Expression and function of P-glycoprotein in rats with glycerol-induced acute renal failure. **Eur J Pharmacol**. v. 406, n. 3, p453-p460, 2000.

INUI, K-I., MASUDA, S., SAITO, H. Cellular and molecular aspects of drugs transport in the kidney. **Kidney Int**. v. 58, n. 3, p944-p958, 2000.

ITO, S. Drug secretion systems in renal tubular cells: functional models and molecular identity. **Pediatr Nephrol.** v. 13, n. 9, p980-p988, 1999.

ITO, S., WOODLAND, C., SARKADI, B., HOCKMANN, G., WALKER, S.E., KOREN, G. Modeling of P-glycoprotein-involved epithelial drug transport in MDCK cells. **Am J Physiol.** v. 277, n. 1 Pt 2, pF84-pF96, 1999.

JOHNSON, D.W., SAUNDERS, H.J., JOHNSON, F.J., HUQ, S.O., FIELD, M.J., POLLOCK, C.A. Cyclosporin exerts a direct fibrogenic effect on human tubulointerstitial cells: roles of insulin-like growth factor I, transforming growth factor beta1, and platelet-derived growth factor. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 289, n. 1, p535-p542, 1999.

JOHNSTONE, R.W., RUEFLI, A.A., SMYTH, M.J. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? **Trends Biochem Sci.** v. 25, 1, p1-p6, 2000.

JULIANO, R.L., LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochim Biophys Acta.** v. 455, n. 1, p152-p162, 1976.

KAHAN, B.D. Cyclosporine: a revolution in transplantation. **Transplant Proc.** v. 31, n. 1-2A, p14S-p15S, 1999.

KAHAN, B.D. Optimization of cyclosporine therapy. **Transplant Proc.** v. 25, n. 4-3, p5-p9, 1993.

KIM, R.B., FROMM, M.F., WANDEL, C., LEAKE, B., WOOD, A.J., RODEN, D.M., WILKINSON, G.R. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. **J Clin Invest.** v. 101, n. 2, p289-p294, 1998.



KOVARIK, J.M., MUELLER, E.A., VAN BREE, J.B., FLUCKIGER, S.S., LANGE, H., SCHMIDT, B., BOESKEN, W.H., LISON, A.E., KUTZ, K. Cyclosporine pharmacokinetics and variability from a microemulsion formulation--a multicenter investigation in kidney transplant patients. **Transplantation**. v. 58, n. 6, p658-p663, 1994.

KOZIOLEK, M.J., RIESS, R., GEIGER, H., THEVENOD, F., HAUSER, I.A. Expression of multidrug resistance P-glycoprotein in kidney allografts from cyclosporine A-treated patients. **Kidney Int**. v. 60, n. 1, p156-p166, 2001.

KRISHNA, R., MAYER, L.D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. **Eur J Pharm Sci**. v. 11, n. 4, p265-p283, 2000.

LARSEN, A.K., ESCARGUEIL, A.E., SKLADANOWSKI, A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. **Pharmacol Ther**. v. 85, n. 3, p217-p229, 2000.

LENSMEYER, G.L., WIEBE, D.A., CARLSON, I.H., SUBRAMANIAN, R. Concentrations of cyclosporin A and its metabolites in human tissues postmortem. **J Anal Toxicol**. v. 15, n. 3, p110-p115, 1991.

LIU, J., FARMER, J.D., J.R., LANE, W.S., FRIEDMAN, J., WEISSMAN, I., SCHREIBER, S.L. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. **Cell**. v. 266, n. 4, p807-p815, 1991.

MASEREEUW, R., MOONS, M.M., RUSSEL, F.G. Rhodamine 123 accumulates extensively in the isolated perfused rat kidney and is secreted by the organic cation system. **Eur J Pharmacol.** v. 321, n. 3, p315-p323, 1997.

MCCLEAN, S., WHELAN, R.D., HOSKING, L.K., HODGES, G.M., THOMPSON, F.H., MEYERS, M.B., SCHUURHUIS, G.J., HILL, B.T. Characterization of the P-glycoprotein over-expressing drug resistance phenotype exhibited by Chinese hamster ovary cells following their in-vitro exposure to fractionated X-irradiation. **Biochim Biophys Acta.** v. 1177, n. 2, p117-p126, 1993.

MCGRATH, T., CENTER, M.S. Adriamycin resistance in HL60 cells in the absence of detectable P-glycoprotein. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 145, n. 3, p1171-p1176, 1987

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** v. 65, n. 1-2, p55-p63, 1983.

MYERS, B.D. Cyclosporine nephrotoxicity. **Kidney Int.** v. 30, n. 6, p964-p974, 1986.

NAITO, M., OH-HARA, T., YAMAZAKI, A., DANKI, T., TSURUO, T. Reversal of multidrug resistance by an immunosuppressive agent FK-506. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 29, n. 3, p195-p200, 1992.

NEYFAKH, A.A. Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. **Exp Cell Res.** v. 174, n. 1, p168-p176, 1988.

ROMITI, N., TRAMONTI, G., CHIELI, E. Influence of different chemicals on MDR-1 P-glycoprotein expression and activity in the HK-2 proximal tubular cell line. **Toxicol Appl Pharmacol.** v.183, n. 2, p83-p91, 2002.

ROSSI, N.F., CHURCHILL, P.C., MCDONALD, F.D., ELLIS, V.R. Mechanism of cyclosporine A-induced renal vasoconstriction in the rat. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 250, n. 3, p896-p901, 1989.

SAEKI, T., UEDA, K., TANIGAWARA, Y., HORI, R., KOMANO, T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. **J Biol Chem.** v. 268, n. 9, p6077-p6080, 1992.

SCHARFSTEIN, J., SCHMITZ, V., MORANDI, V., CAPELLA, M.M., LIMA, A.P., MORROT, A., JULIANO, L., MULLER-ESTERL, W. Host cell invasion by Trypanosoma cruzi is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. **J Exp Med.** v. 192, n. 9, p1289-p1300, 2000.

SCHINKEL, A.H., WAGENAAR, E., VAN DEEMTER, L., MOL, C.A., BORST, P. Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. **J Clin Invest.** v. 96, n. 4, p1698-p1705, 1995.

SEELIG, A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. **Eur J Biochem.** v. 251, n. 1-2, p252-p261, 1998.

SEELIG, A., LANDWOJTOWICZ, E. Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers. **Eur J Pharm Sci.** v. 12, n. 1, p31-p40, 2000.

SINGH, D., ALEXANDER, J., OWEN, A., RUSTOM, R., BONE, M., HAMMAD, A., ROBERTS, N., PARK, K., PIRMOHAMED, M. Whole-blood cultures from renal-transplant patients stimulated ex vivo show that the effects of cyclosporine on lymphocyte proliferation are related to P-glycoprotein expression. **Transplantation**. v. 77, n. 4, p557-p561, 2004.

TAMAI, I., SAFA, A.R. Competitive interaction of cyclosporins with the Vinca alkaloid-binding site of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. **J Biol Chem**. v. 265, n. 27, p16509-p16513, 1990.

TSURUOKA, S., SUGIMOTO, K.I., FUJIMURA, A., IMAI, M., ASANO, Y., MUTO, S. P-glycoprotein-mediated drug secretion in mouse proximal tubule perfused in vitro. **J Am Soc Nephrol**. v. 12, n. 1, p177-p181, 2001.

TSURUO, T., IIDA, H., TSUKAGOSHI, S., SAKURAI, Y. Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. **Cancer Res**. v. 42, n. 11, p4730-p4733, 1982.

TWENTYMAN, P.R. Cyclosporins as drug resistance modifiers. **Biochem Pharmacol**. v. 43, n. 1, p109-p117, 1992.

UCHIUMI, T., KOHNO, K., TANIMURA, H., MATSUO, K., SATO, S., UCHIDA, Y., KUWANO, M. Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. **Cell Growth Differ**. v. 4, 3, p147-p157, 1993.

UEDA, K., OKAMURA, N., HIRAI, M., TANIGAWARA, Y., SAEKI, T., KIOKA, N., KOMANO, T., HORI, R. Human P-glycoprotein transports cortisol,

aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. **J Biol Chem.** v. 267, n. 34, p24248-p24252, 1992.

VAN DER SANDT, I.C., BLOM-ROOSEMALEN, M.C., DE BOER, A.G., BREIMER, D.D. Specificity of doxorubicin versus rhodamine-123 in assessing P-glycoprotein functionality in the LLC-PK1, LLC-PK1:MDR1 and Caco-2 cell lines. **Eur J Pharm Sci.** v. 11, n. 3, p207-p214, 2000.

WILKINSON, G.R. Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans. **J Pharmacokinet Biopharm.** v. 24, n. 5, p475-p490, 1996.

ZHANG, L., SACHS, C.W., FU, H.W., FINE, R.L., CASEY, P.J. Characterization of prenylcysteines that interact with P-glycoprotein and inhibit drug transport in tumor cells. **J Biol Chem.** v. 270, n. 39, p22859-p22865, 1995.

### **7.1 – Referências bibliográficas de documentos em meio eletrônico**

<[www.gen.umn.edu/.../ wa\\_wbc\\_nephron4.jpg](http://www.gen.umn.edu/.../ wa_wbc_nephron4.jpg)> Acesso em: 29 nov. 2004.

<[www.kidney.ca/.../ kidneys\\_en.gif](http://www.kidney.ca/.../ kidneys_en.gif)> Acesso em: 29 nov. 2004.

## **ANEXO: ARTIGO PUBLICADO**

Nascimento, C.R. ; Braga, F. ; Capella, L.S. ; Santos, O.R. ; Lopes, A.G. ; Capella, M.A.M.  
Nephron Exp Nephrol 2005;99:e77-e86

“Comparative Study on the Effects of Cyclosporin A in Renal Cells in Culture”







































# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)