

FILIPE BRAGA DOS SANTOS

EFEITO DO ÁCIDO OLEANÓLICO SOBRE A
ATIVIDADE DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À
RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (PGP/ABCB1
E MRP1/ABCC1)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO 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
2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

EFEITO DO ÁCIDO OLEANÓLICO SOBRE A ATIVIDADE DE PROTEÍNAS
RELACIONADAS À RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (PGP/ABCB1 E
MRP1/ABCC1)

Autor: Filipe Braga dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Orientadores: Cerli Rocha Gattass e Márcia Alves Marques Capella.

Rio de Janeiro

Fevereiro, 2006.

Os dados experimentais desta dissertação foram obtidos no Laboratório de Imunologia Celular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

FICHA CATALOGRÁFICA

dos Santos, Filipe Braga

Efeito do Ácido Oleanólico sobre a atividade de proteínas relacionadas à resistência a múltiplas drogas (Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1)/ Filipe Braga dos Santos. Rio de Janeiro: UFRJ/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2006.

xv, 74f: il.; 29,7cm.

Orientador: Cerli Rocha Gattass e Márcia Alves Marques Capella.

Dissertação (mestrado) – UFRJ / IBCCF / Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), 2006.

Referências Bibliográficas: f.61-74

1)Ácido Oleanólico. 2) Pgp/ABCB1. 3) MRP1/ABCC1. 4) Ma104. I. Gattass, Cerli Rocha e Capella, Márcia Alves Marques. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia). III. Efeito do Ácido Oleanólico sobre a atividade de proteínas relacionadas à resistência a múltiplas drogas (Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1).

Dedico esta dissertação aos meus amados avós

Conceição Cunha dos Santos e Humberto dos Santos

Izolina da Silveira Braga e Juliriano Augusto de Torres Braga

AGRADECIMENTOS

À Deus.

A cada pessoa que está na minha vida e no meu coração, como amigo ou companheiro, porque é colaboradora ativa da elaboração desta dissertação.

“Principalmente por poder voltar
A todos os lugares onde já cheguei
Pois lá deixei um prato de comida
Um abraço amigo
E um canto pra dormir e sonhar
E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas
E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente
Onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho
Por mais que pense estar
É tão bonito quando a gente pisa firme
Nessas linhas que estão
Nas palmas de nossas mãos
É tão bonito
Quando a gente vai à vida
Nos caminhos onde bate
Bem mais forte o coração”
(Gonzaguina)

Tendo agradecido a todos, destaco amigos e companheiros mais diretamente envolvidos nesta etapa de confecção da dissertação.

Às minhas queridas orientadoras Cerli Rocha Gattass e Márcia Alves Marques Capella que cuidaram de mim como um filho.

Ao amigo João Marcos, que dividiu comigo os desafios do estudo das proteínas relacionadas a múltiplas drogas.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular, pelo respeito e carinho durante estes dois anos de esforço.

Ao professor Gilberto Weissmüller pelas discussões férteis.

Ao amigo Ney Proença, cada letra deste texto possui sua marca, por isso você está marcado na minha vida.

A Cristina Delou, pelas referências, pelo carinho e pela torcida.

Ao Diogo e a Sandra que foram sempre atenciosos e solícitos comigo.

A Juciara pela atenção e carinho.

A minha amiga e namorada Gizele, a minhas amigas e irmãs Verônica e Gabriela, e aos meus amigos e pais Anarlete e Cesar pelo amor incondicional.

RESUMO

EFEITO DO ÁCIDO OLEANÓLICO SOBRE A ATIVIDADE DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (PGP/ABCB1 E MRP1/ABCC1)

Autor: Filipe Braga dos Santos

Orientadores: Cerli Rocha Gattass e Márcia Alves Marques Capella.

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

O Ácido Oleanólico (AO) é um triterpeno pentacíclico que possui diversos efeitos biológicos tais como: anti-inflamatório, anti-HIV e anti-tumoral. Também já foi descrito que o AO é citotóxico para uma linhagem resistente a múltiplas drogas que superexpressa Pgp/ABCB1. A Pgp/ABCB1 e a MRP1/ABCC1 são proteínas da superfamília ABC de transportadores transmembranar que atuam como bomba de efluxo de substâncias, contra gradiente de concentração e de forma dependente de ATP. Dentre os substratos para o transporte realizado por estas proteínas estão drogas utilizadas na quimioterapia de doenças como o câncer e a AIDS. A identificação da expressão destas proteínas em tecidos normais e estudos utilizando animais “knockout” revelaram o envolvimento destas proteínas com a absorção, eliminação e distribuição de xenobióticos e na proteção de tecidos. Neste estudo foi utilizada a linhagem celular Ma104 (derivada de rim de embrião de macaco rhesus), que expressa Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1, para investigar se o AO é capaz de inibir o transporte mediado pela Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1. Foram utilizadas duas sondas fluorescentes para avaliar o efeito do AO sobre estas duas proteínas. O AO não teve efeito sobre a Pgp/ABCB1, mas inibiu a atividade de transporte da MRP1/ABCC1, de forma dose-dependente e reversível. O MK571, um potente inibidor da atividade da MRP1/ABCC1, foi capaz de potencializar os efeitos citotóxicos do AO, sugerindo que o AO é um substrato transportado pela MRP1/ABCC1. A atividade anti-tumoral do AO somada ao fato dele não modular a Pgp/ABCB1 pode indicá-lo para uso na clínica em combinação com outros quimioterápicos que são substratos para a Pgp/ABCB1, evitando mudanças na biodisponibilidade destes últimos. O fato do AO inibir a atividade da MRP1/ABCC1 pode indicá-lo para uso na clínica como reversor do fenótipo MDR em tratamento de tumores MRP1/ABCC1 positivos. Além disso, pode explicar alguns efeitos biológicos do AO que envolvem a expressão da MRP1/ABCC1 tais como o anti-inflamatório e o anti-HIV.

Palavras-chave: Ácido Oleanólico; Pgp/ABCB1; MRP1/ABCC1; Ma104
Rio de Janeiro
Fevereiro, 2006.

ABSTRACT**OLEANOLIC ACID EFFECT ON ACTIVITY OF MULTIDRUG RESISTANCE RELATED PROTEIN (PGP/ABCB1 E MRP1/ABCC1)**

Autor: Filipe Braga dos Santos

Orientadores: Cerli Rocha Gattass e Márcia Alves Marques Capella.

Abstract da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Oleanolic Acid (OA) is a pentacyclic triterpene with a broad spectrum of biological effects such as anti-inflammatory, anti-HIV and anti-cancer. It has been described that OA is cytotoxic against a multidrug resistance cell line that expresses Pgp/ABCB1. Pgp/ABCB1 and MRP1/ABCC1 belong to the ABC superfamily of transport proteins that act like drug efflux pumps against concentration gradient in an ATP dependent manner. Among substrates for these proteins are substances used as chemotherapeutics in cancer and AIDS. The expression of these proteins in normal tissues and studies with knockout animals show that Pgp/ABCB1 and MRP1/ABCC1 are involved in absorption, excretion and distribution of xenobiotics and in tissue protection. In this present study, the Ma104 cell line (derived from kidney embryo rhesus monkey), which expresses constitutively both Pgp/ABCB1 and MRP1/ABCC1, was used to investigate the modulation of the transport ability of these proteins by OA. Two fluorescent substrates were used to measure Pgp/ABCB1 and MRP1/ABCC1 activity. OA did not show any effect on Pgp/ABCB1, but inhibited the MRP1/ABCC1 activity in a dose-dependent and reversible manner. MK571, an inhibitor of MRP1/ABCC1 activity, increased the cytotoxicity of OA, suggesting that OA is a substrate for MRP1/ABCC1 transport. The anti-tumor activity of OA together with the failure in modulating Pgp/ABCB1 suggest its clinical use in combination with other chemotherapeutics, including those that are Pgp/ABCB1 substrates, with no change in their bioavailability. The modulation of MRP1/ABCC1 by OA suggests a clinical use as a MDR reversor agent on MRP1/ABCC1 positive tumors. In addition, MRP1/ABCC1 inhibition may explain some biological effects of OA that involve MRP1/ABCC1 expression; e.g. the anti-inflammatory and anti-HIV effects of OA.

Key-words: Oleanolic Acid, Pgp/ABCB1; MRP1/ABCC1; Ma104
Rio de Janeiro
Fevereiro, 2006.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	iii
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ÁCIDO OLEANÓLICO	2
<i>1.1.1 Classificação química</i>	2
<i>1.1.2 Efeitos Biológicos</i>	2
1.2 GLICOPROTEÍNA P (Pgp/ABCB1)	6
<i>1.2.1 Descoberta e caracterização</i>	6
<i>1.2.2 Importância da Pgp/ABCB1 na Fisiologia e Fisiopatologia</i>	10
<i>1.2.3 Importância da Pgp/ABCB1 na Quimioterapia</i>	12
1.3 PROTEÍNA ASSOCIADA A RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (MRP1/ABCC1)	14
<i>1.3.1 Descoberta e caracterização</i>	14
<i>1.3.2 Importância da MRP1/ABCC1 na Fisiologia e Fisiopatologia</i>	18
<i>1.3.3 Importância da MRP1/ABCC1 na Quimioterapia</i>	21
2. JUSTIFICATIVAS & OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 MATERIAL	25
<i>3.1.1 Soluções e reagentes</i>	25
3.2 MÉTODOS	27
3.2.1 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA	27
3.2.2 MEDIDA DE ATIVIDADE DE Pgp/ABCB1 E MRP1/ABCC1	27
3.2.2.a Rodamina 123 -sonda para medir atividade Pgp/ABCB1	28

3.2.2.b	<i>5,(6)-carboxifluoresceína - sonda para medir atividade de MRP1/ABCC1</i>	
		28
3.2.2.c	<i>Ciclosporina A (CSA) - modulador da atividade da Pgp/ABCB1</i>	
		28
3.2.2.d	<i>MK571 - modulador da atividade da MRP1/ABCC1</i>	29
3.2.2.e	<i>Protocolos de medida de atividade das proteínas Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1</i>	29
3.2.2.f	<i>Curva temporal de acúmulo de Ro123</i>	30
3.2.2.g	<i>Efeito da CSA sobre o acúmulo de Ro123</i>	30
3.2.2.h	<i>Curva temporal de acúmulo de CF</i>	30
3.2.2.i	<i>Curva temporal de extrusão de CF</i>	30
3.2.2.j	<i>Efeito do MK571 sobre o acúmulo de CF</i>	30
3.2.2.k	<i>Efeito do MK571 na extrusão de CF</i>	31
3.2.2.l	<i>Efeito do AO sobre acúmulo de Ro123</i>	31
3.2.2.m	<i>Efeito do AO sobre acúmulo de CF</i>	31
3.2.2.n	<i>Efeito de AO sobre a extrusão de CF</i>	31
3.2.2.o	<i>Extrusão de CF após acúmulo de CF na presença de AO</i>	32
3.2.3	EFEITO DO MK571 SOBRE A TOXICIDADE DO AO	
		32
3.2.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
3.2.4.a	<i>Efeito do AO sobre acúmulo de CF</i>	33
3.2.4.b	<i>Efeito de AO sobre a extrusão de CF</i>	33
3.2.4.c	<i>Extrusão de CF após acúmulo de CF na presença de AO</i>	34
3.2.4.d	<i>Efeito do MK571 sobre a toxicidade do AO</i>	34
4.	RESULTADOS	35
4.1	<i>Curva temporal de acúmulo de 200 ng/ml de Ro123</i>	36
4.2	<i>Efeito da CSA sobre o acúmulo de Ro123</i>	37
4.3	<i>Curva temporal de acúmulo de CF</i>	38
4.4	<i>Curva temporal de extrusão de CF</i>	39
4.5	<i>Efeito do MK571 sobre o acúmulo e a extrusão de CF</i>	40
4.6	<i>Efeito do AO sobre acúmulo de Ro123</i>	42

<i>4.7 Efeito do AO sobre acúmulo de CF</i>	44
<i>4.8 Efeito de AO sobre a extrusão de CF</i>	46
<i>4.9 Reversibilidade da inibição da atividade da MRP1/ABCC1 pelo AO</i>	48
4.10 EFEITO DO MK571 SOBRE A TOXICIDADE DO AO	50
5. DISCUSSÃO	51
<i>5.1 AO e Pgp/ABCB1</i>	52
<i>5.2 AO e MRP1/ABCC1</i>	53
6. CONCLUSÕES	57
7. PERSPECTIVAS	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: acetaminofen

ABC: Família "ATP binding cassette"

ADR: Adriamicina

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

ANOVA: Análise de variância

AO: Ácido Oleanólico

APA-SG: Azidofenacilglutaciona

APT: Attached Proton Transfer

ATP: Adenosina trifosfato

BSO: Butionina sulfoximina

CCl₄: Tetracloroeto de carbono

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar.

CF: 5,(6) - carboxifluoresceína

CFDA: 5,(6) - carboxifluoresceína diacetato

COX-1: Ciclooxygenase 1

COX-2: Ciclooxygenase 2

CSA: Ciclosporina A

D.O.: Densidade ótica

DKO: "Double knock-out"

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DNP-SG: Glutaciona S-(2,4-dinitrofenil)

γ -GCS: Glutamil cisteíno sintetase

GSH: Glutationa reduzida

GSSG: Glutationa oxidada

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

IC₅₀: Concentração para 50% da atividade

kb: Quilo bases

kDa: Quilo daltons

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LTB₄: Leucotrieno B₄

LTC₄: Leucotrieno C₄

LTD₄: Leucotrieno D₄

MDR: Resistência a múltiplas drogas

MIF: Média geométrica de intensidade de fluorescência

MRP: Proteína associada à resistência a múltiplas drogas

MRP1/ABCC1: Proteína associada à resistência a múltiplas drogas

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol

NFκB: Fator nuclear kappa B

PBS: Solução salina tamponada

Pgp/ABCB1: Glicoproteína P

RNA: Ácido ribonucléico

RNA_m: Ácido ribonucléico mensageiro

Ro123: Rodamina 123

SFB: Soro fetal bovino

TKO: “Triple knockout”

VP: Verapamil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclização do oxidoesqualeno formando o ácido oleanólico	2
Figura 2: Curva temporal do acúmulo de Ro123 em células Ma104	36
Figura 3: Efeito da CSA sobre o acúmulo de Ro123 em células Ma104	37
Figura 4: Curva temporal do acúmulo de CF em células Ma104	38
Figura 5: Curva temporal de extrusão de CF em células Ma104	39
Figura 6: Efeito do MK571 sobre o acúmulo de CF em células Ma104	41
Figura 7: Efeito do MK571 sobre a extrusão de CF em células Ma104	41
Figura 8: Efeito do AO sobre o acúmulo de Ro123 em células Ma104	43
Figura 9: Efeito do AO sobre o acúmulo de CF em células Ma104	45
Figura 10: Efeito do AO sobre a extrusão de CF em células Ma104	47
Figura 11: Efeito do AO sobre a extrusão de CF após acúmulo de CF em células Ma104	49
Figura 12: Efeito do MK571 sobre a toxicidade do AO	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Expressão e localização da proteína Pgp/ABCB1	12
Tabela 2: Expressão e localização da proteína MRP1/ABCC1	20

1. INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDO OLEANÓLICO

1.1.1 Classificação química

O Ácido Oleanólico (ácido 3 β -hidroxi-olea-12-en-28-óico) é um triterpeno pentacíclico. Os triterpenos são considerados metabólitos secundários originados da via bioquímica secundária das plantas, onde têm origem na ciclização do esqualeno (LIU, 1995a). Na Figura 1 está representada a estrutura química do ácido oleanólico.

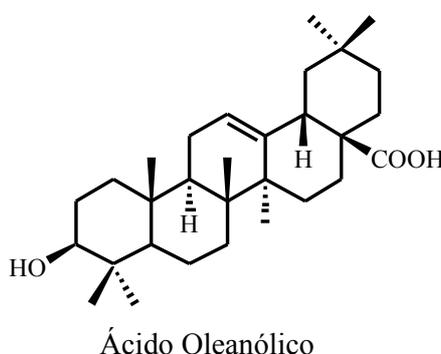


Figura 1. Ácido Oleanólico (DEWICK, 1997).

1.1.2 Efeitos Biológicos

O Ácido Oleanólico (AO) é uma substância que já foi isolada de mais de 120 espécies de plantas, dentre elas muitas ervas medicinais. Por exemplo, o ginseng, a raiz da *Panax ginseng* C.A. Meyer, é conhecido entre os povos dos países do Leste Asiático, desde tempos antigos, como uma droga preciosa para a longevidade ou cura de doenças. Um dos princípios ativos do ginseng é o ácido oleanólico. Já a planta *Sambucus chinensis* Lindl. é utilizada para tratar desordens inflamatórias e hepatite aguda na medicina popular chinesa e o AO também foi identificado como um dos componentes ativos responsáveis pelo efeito hepatoprotetor (LIU, 1995a).

Os efeitos hepatoprotetor, anti-inflamatório, analgésico, cardiotônico e sedativo são alguns exemplos de efeitos biológicos atribuídos a plantas que contêm o AO, utilizadas pela medicina popular. Apesar do AO ter sido considerado por muito tempo como biologicamente inativo, o seu isolamento químico em plantas medicinais atraiu o interesse dos cientistas para seus supostos efeitos farmacológicos, combinados a uma baixa toxicidade (LIU, 1995a). Muitos dos efeitos terapêuticos, referidos na medicina popular, foram confirmados e novas atividades biológicas com potencial terapêutico foram descobertas pela pesquisa científica contemporânea, incluindo as atividades hepatoprotetora (LIU, 1995a; LIU *et al.*, 1995b), anti-inflamatória, anti-anti-úlceras, anti-HIV, apoptótica, anti-tumoral (LIU, 1995a; LIU *et al.*, 1995b; OVESNÁ *et al.*, 2004). hiperlipidêmica, hipoglicêmica, diurética (SAMOVA *et al.*, 2003), entre outras.

Na China o AO é utilizado tradicionalmente no tratamento de hepatites. O efeito hepatoprotetor do AO parece ser devido a múltiplos mecanismos, mas o que mais se destaca é a inibição da atividade e expressão do complexo de ativação metabólica P-450. Em 1993, Liu *et al.*, observando o aumento de glutatona (GSH) intracelular nos hepatócitos, sugeriram que o AO iniba a ativação tóxica do acetaminofen (AA) realizada pelo complexo P-450. Em 1995, Liu *et al.* demonstraram que o tratamento de camundongos com AO suprime algumas enzimas P-450 de microsomas hepáticos, especialmente CYP1A e CYP2A, e aumenta alguns mecanismos celulares de defesa, como a GSH, a GSH-transferase, metaloproteínas e o zinco, sugerindo novamente que os efeitos hepatoprotetores do AO podem ser devidos, pelo menos em parte, a alterações na ativação e na detoxificação de substâncias hepatotóxicas. Em 1999, Jeong mostrou que o AO protege contra a hepatotoxicidade de tetracloreto de carbono (CCl₄) e que o tratamento com AO, em camundongos desafiados com CCl₄, recupera os níveis de GSH devido à diminuição da expressão e da atividade de P-450 2E1.

O efeito antiinflamatório do AO foi relatado primeiramente nos anos 60, em estudos que mostraram os efeitos inibitórios do AO no edema de pata, induzido por carragena, e na artrite induzida por formaldeído, em ratos (GUPTA *et al.*, 1969). Posteriormente, o efeito anti-inflamatório do AO foi descrito em outros modelos de inflamação, como a inibição da formação de edema induzido por dextran, em pata de rato, a inibição de formação de edema induzido por fosfolipase A₂, em camundongos, e a supressão da artrite induzida por adjuvante, em ratos e camundongos (LIU, 1995a; GINER-LARZA *et al.*, 2001). A atividade antiinflamatória do AO também foi estudada *in vitro* por Ringbom *et al.* (1998), que descreveram que o AO inibe as atividades das enzimas catalizadoras de prostaglandinas COX-1 e COX-2, com um IC₅₀ de 380µM e 295µM. Além disto, Díaz *et al.* (2000) observaram que o AO inibiu a liberação de prostaglandina E₂ e leucotrieno C₄ (LTC₄) de macrófagos ativados por ionóforos de cálcio.

O efeito anti-ulcerativo e gastroprotetor do AO tem sido descrito em modelos de úlcera gástrica induzida em ratos por etanol, aspirina, ligadura de piloro e ácido acético, e em modelos de úlcera induzida em camundongo por etanol/ácido hidroclorídrico. Os animais tratados com AO têm a área de lesão diminuída e um aumento da espessura da mucosa gástrica, quando comparados com os animais controles (RODRÍGUEZ *et al.*, 2003).

Os efeitos anti-hiperlipidêmico e hipoglicêmico foram encontrados em ratos hipertensos e resistentes à insulina tratados com AO. Observou-se uma potente redução dos níveis de glicose no sangue, diminuição de colesterol total, LDL e triglicérides, e aumento do HDL. Além disto, foi observado a diminuição da reabsorção de Na⁺ na porção inicial do túbulo distal, gerando diurese (SAMOVA *et al.*, 2003).

A atividade anti-HIV do AO, pela supressão da replicação viral, foi demonstrada *in vitro*. O AO reduziu o antígeno p24 no sobrenadante de culturas de células da linhagem

celular H9 (células T) infectadas com HIV, quando comparadas às células infectadas com HIV não tratadas com AO (KASHIWADA *et al.*, 1998; ZHU *et al.*, 2001).

Hsu *et al.* (1997) mostraram a atividade anti-tumoral do AO pela inibição marcante do crescimento de células de tumor (sarcoma-180) implantadas em camundongos. Kim *et al.* (2000) mostraram efeito citotóxico *in vitro* do ácido oleanólico em cinco linhagens celulares tumorais: A549 (“non-small cancer cells”), SK-OV-3 (ovário), SK-MEL-2 (melanoma), XF498 (sistema nervoso central) e HCT-15 (colon). Além disto, Li *et al.* (2002), utilizando a linhagem HCT15, de carcinoma de colon, observaram que o AO inibiu o crescimento celular, induzindo parada no ciclo celular.

Mais recentemente, foi descrito por Fernandes *et al.* (2003) que o ácido oleanólico foi capaz de inibir, de forma similar, tanto o crescimento de células de eritroleucemia humana sensíveis a drogas (K562), quanto o crescimento de células de eritroleucemia resistentes a múltiplas drogas (K562-Lucena 1). Além disso, o AO pareceu não ser substrato para o transporte mediado pela Glicoproteína-P (Pgp/ABCB1), uma das responsáveis pelo fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) da K562-Lucena1, sendo sugerido que o AO não modula a atividade de transporte da Pgp/ABCB1. Nenhum trabalho relata o efeito do AO sobre a atividade de transporte da MRP1/ABCC1, que também é uma proteína capaz de conferir o fenótipo MDR.

1.2 GLICOPROTEÍNA P (Pgp/ABCB1)

1.2.1 *Descoberta e caracterização*

A descoberta da Pgp/ABCB1 está intimamente relacionada ao desenvolvimento dos estudos de caracterização dos mecanismos que conferem a resistência a múltiplas drogas em linhagens celulares.

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é definida como a capacidade de células resistirem à citotoxicidade de drogas que não são semelhantes quer estruturalmente, quer em relação aos mecanismos de ação, sendo este fenótipo considerado o principal mecanismo de insucesso nos tratamentos de câncer (BIEDLER e RIEHM, 1970; GOTTESMAN, 2002b).

Uma das primeiras descrições da resistência a múltiplas drogas foi feita em linhagens celulares de tecidos normais de hamster chinês que, quando submetidas a doses crescentes de quimioterápicos tornaram-se resistentes não somente a elevadas doses do quimioterápico utilizado na seleção, mas também a outros quimioterápicos não utilizados na seleção química e que não apresentavam semelhança na estrutura química e no mecanismo de citotoxicidade (BIEDLER e RIEHM, 1970). Posteriormente, Dano (1973), utilizando linhagens de células tumorais, caracterizou o fenótipo MDR como resultante da atividade de transporte de drogas para fora das células, dependente de energia e contra o gradiente de concentração. Estas conclusões foram obtidas a partir da observação de que o acúmulo do quimioterápico daunomicina em linhagens resistentes foi menor do que na linhagem parental, e que as células resistentes tratadas com inibidores metabólicos e com inibidores competitivos, restauraram o acúmulo de daunomicina aos níveis encontrados nas células sensíveis.

Finalmente, em 1976, Juliano e Ling, utilizaram várias linhagens de ovário de hamster chinês, com diferentes níveis de resistência a múltiplas drogas, e identificaram nestas linhagens uma glicoproteína de 170kDa que estava ausente na linhagem parental. Os autores

também estabeleceram uma correlação positiva entre a quantidade desta glicoproteína e os níveis de resistência. Como esta proteína estava associada à linhagens com alteração de permeabilidade a drogas, ela foi nomeada Glicoproteína P (Pgp).

Em 1982, Debenham *et al.* induziram resistência em células de camundongos a partir da transferência de DNA de células de ovário de hamster chinês resistentes a múltiplas drogas. Além disso, os autores estabeleceram o primeiro anticorpo contra a Pgp e, utilizando este anticorpo, identificaram a expressão de Pgp nas células de camundongos receptores. A expressão de Pgp também foi identificada em células humanas.

Em 1985, Fojo *et al.* caracterizaram a redução de acúmulo de drogas e o efluxo de drogas em linhagens de células KB, de carcinoma humano, selecionadas com colchicina, que apresentavam resistência a múltiplas drogas. Cornwell *et al.* (1986) identificaram a superexpressão de uma proteína de 170 kDa em células KB resistentes a múltiplas drogas (KB-C4 – selecionada por colchicina e KB-V1 – selecionada com vinblastina).

As linhagens celulares resistentes a múltiplas drogas, obtidas por seleção química, possuíam regiões de DNA amplificadas. Esta amplificação gênica foi caracterizada em linhagens de células de hamster e humanas. Uma seqüência de DNA comumente amplificada foi denominada de gene *mdr1*; e verificou-se que este gene codificava um RNA mensageiro (RNAm) de, aproximadamente, 5-kb, compatível com um peptídeo de 170 kDa (FOJO *et al.*, 1985; GROS *et al.*, 1986). Shen *et al.* (1986) transferiram um segmento de DNA contendo o gene *mdr1* de células de carcinoma humano KB para células de camundongo NIH 3T3, conferindo o fenótipo MDR à linhagem receptora.

Identificado o gene *mdr1* como responsável pela resistência a múltiplas drogas, seu sequenciamento revelou que o mesmo codificava uma proteína de 1280 aminoácidos, consistente com a estimativa do tamanho da Pgp. A análise da seqüência revelou a presença

de 12 regiões transmembrana e dois sítios de ligação para ATP indicando ser a Pgp uma bomba de efluxo de substâncias dependente de energia (CHEN *et al.*, 1986).

Com a seqüência do *mdr1* foi construído um DNA complementar para o gene *mdr1* humano, que foi capaz de causar resistência a múltiplas drogas em linhagens de camundongo NIH 3T3 transfectadas com cópias desta seqüência. Estas linhagens foram capazes de produzir Pgp funcional, sugerindo ser suficiente a superexpressão do gene *mdr1* para a aquisição do fenótipo MDR (UEDA , 1987a; UEDA,1987b).

Devido à sua localização transmembrana e seus sítios de ligação para ATP, a Pgp é considerada membro da superfamília ABC de transportadores (“ATP-Binding Cassete”). Dentro desta superfamília ela faz parte da família MDR/ABCB de proteínas homólogas. Recentemente a Pgp também passou a ser chamada de proteína ABCB1 e o gene *MDR1*, que codifica para a Pgp em humanos, passou a ser chamado gene *ABCB1*. Neste trabalho, a partir deste ponto, a proteína Pgp será referida pela unificação do seu nome clássico com a nova nomenclatura: Pgp/ABCB1 (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>)

Com a identificação da Pgp/ABCB1 como um transportador transmembrana, pela análise da sua seqüência, foi identificado o principal mecanismo responsável pela resistência a múltiplas drogas das linhagens celulares que superexpressavam Pgp/ABCB1 e possuíam o gene *mdr1* amplificado. A reduzida permeabilidade a drogas era resultado da atividade, dependente de energia, da Pgp/ABCB1, sendo capaz de realizar a extrusão das drogas contra os seus gradientes de concentração.

Confirmando que a Pgp/ABCB1 é uma bomba de efluxo, dois estudos mostraram a redução do transporte de substâncias mediado pela Pgp/ABCB1 utilizando anticorpos contra a Pgp/ABCB1 capazes de inibir a atividade de transporte. Hamada e Tsuru (1986), utilizando o anticorpo MRK16, que reconhece a Pgp/ABCB1, mostraram um aumento do acúmulo de drogas citotóxicas (vincristina, actinomicina D e Adriamicina) que restaurou, parcialmente, a

sensibilidade das células da linhagem leucêmica, resistente a múltiplas drogas, K562/ADM. Mechetner e Roninson (1992) mostraram que o anticorpo UIC2 é capaz de reverter a resistência da linhagem BALB/c 3T3-1000, que superexpressa Pgp, à vincristina, vimblastina, colchicina, taxol, doxorubicina, etoposideo, actinomicina D, puromicina e gramicidina . Estas drogas já eram consideradas substratos para o transporte dependente de ATP mesmo antes da Pgp/ABCB1 ser descoberta (JULIANO e LING, 1976; CORNWELL *et al.*, 1986; HORIO *et al.*, 1988; MECHETNER e RONINSON; 1992).

Além de drogas citotóxicas, a Pgp/ABCB1 também é capaz de transportar outros tipos de substâncias como o agente imunossupressor ciclosporina A (CSA) e seu análogo FK506 (SAEKI *et al.*, 1993); o verapamil, um bloqueador de canal de cálcio (CALLAGHAN *et al.*, 1993); e a morfina e alguns opiáceos sintéticos (LEE *et al.*, 1998). Também realiza o transporte de hormônios como a aldosterona, o cortisol e a dexametasona, mas parece não transportar progesterona (UEDA *et al.*, 1992). A Pgp/ABCB1 é ainda capaz de transportar agentes retrovirais utilizados no tratamento da AIDS, como o ritonavir, saquinavir e indinavir (LEE *et al.*, 1998).

Além dos exemplos citados, existem outras substâncias que são consideradas substratos para a Pgp/ABCB1, tais como peptídeos hidrofóbicos (AMBUDKAR *et al.*, 1999) e sondas fluorescentes, sendo estas muito utilizadas para o estudo da atividade transportadora desta proteína (HOMOLYA *et al.*, 1993). Como característica geral, os substratos da Pgp/ABCB1 são compostos hidrofóbicos e alguns possuem carga positiva em pH fisiológico (AMBUDKAR *et al.*, 1999).

1.2.2 Importância da Pgp/ABCB1 na Fisiologia e Fisiopatologia

Em 1987, Fojo *et al.* conduziram o primeiro estudo que investigou a expressão do RNAm do gene *mdr1* em tecidos normais humanos. Os resultados encontrados para os tecidos normais revelaram que o *mdr1* é expresso em altos níveis na glândula adrenal e no rim; em níveis intermediários no pulmão, fígado, jejuno, íleo, cólon e reto, e em baixos níveis no cérebro, próstata, medula óssea, linfócitos e estômago. No mesmo ano, Thiebaut *et al.* verificaram a localização celular da Pgp/ABCB1 em tecido normais humanos utilizando o anticorpo para epítipo externo, MRK16. Foram detectados altos níveis de Pgp/ABCB1 no fígado, cólon, jejuno, rim, ductos pancreáticos e glândula adrenal. No fígado a expressão foi encontrada na superfície apical dos hepatócitos dos canalículos biliares. No cólon e jejuno, ela foi encontrada na superfície apical das células colunares. No rim, só houve detecção na superfície apical das células epiteliais do túbulo proximal. E nos ductos pancreáticos a Pgp/ABCB1 também foi encontrada na superfície apical.

Em 1989, Thiebaut *et al.* utilizando um outro anticorpo (C219) mostraram, em ratos, que, além dos tecidos com a expressão detectada pelo MRK16 no estudo anterior, algumas células e capilares dos testículos, bem como células acinares no pâncreas, expressam a Pgp/ABCB1; a análise dos capilares cerebrais e do cerebelo mostraram também forte marcação para a Pgp/ABCB1. Cordon-Cardo *et al.* (1989) mostraram a expressão da Pgp/ABCB1 humana em células endoteliais de vasos sanguíneos em locais que compõem barreiras sangue-tecido, tais como nos vasos do cérebro e testículo.

Em 1991, Chaudhary e Roninson, utilizando dois diferentes anticorpos, detectaram a expressão da Pgp/ABCB1 em células tronco da medula óssea humana. Em 1992, Chaudhary *et al.*, utilizando o anticorpo UIC2, mostraram a expressão de Pgp/ABCB1 em linfócitos de sangue periférico de voluntários normais. As células que tiveram as maiores marcações para Pgp/ABCB1 foram as células “natural killer” (CD56⁺), as células T supressoras (CD8⁺), as

células T citotóxicas (CD4⁺) e os linfócitos B (CD20⁺). A revisão de Fisher *et al.* (1996) ainda inclui a expressão da Pgp/ABCB1 na placenta e em macrófagos.

A expressão da Pgp/ABCB1 nesses diferentes tecidos sugeriu uma função fisiológica relacionada com a absorção e eliminação de substâncias, e a proteção de tecidos (como o cérebro e o testículo) e de células contra endo e xenobióticos (Tabela 1). Como modelo para investigar esta hipótese, Schinkel *et al.* (1997) desenvolveram camundongos deficientes para os genes *mdr1a* e *mdr1b* (em camundongos, os genes *mdr1a* e *mdr1b* parecem dividir os papéis desempenhados pelo gene *MDR1/ABCB1* humano. Além disso, quanto à capacidade de transporte de drogas e padrão de expressão, o gene *mdr1b* difere do gene *mdr1a*, mas são complementares em relação ao gene *MDR1/ABCB1*). Este estudo revelou que a falta destes genes não causou efeitos biológicos vitais nos animais em condições de laboratório. Mas o uso de drogas transportadas pelas Pgps de camundongo demonstrou a função destas proteínas na proteção contra toxinas. As alterações encontradas nestes animais em relação aos animais controle relacionaram-se com a absorção de drogas no intestino, a metabolização e eliminação de drogas pelo fígado e rim, a função das barreiras hematoencefálica, hemato-testicular e placentária e com a proteção das células tronco da medula óssea. Desta forma, ficou confirmando o envolvimento da Pgp/ABCB1 com a farmacocinética e com a proteção de tecidos contra a citotoxicidade de algumas drogas.

As implicações farmacocinéticas da atividade da Pgp/ABCB1 no organismo foram revisadas por Kishna e Mayer (2000), sendo catalogadas as principais demonstrações laboratoriais do envolvimento da Pgp/ABCB1 com a absorção, distribuição e eliminação de drogas.

Nos últimos anos, tem sido sugerido o envolvimento da Pgp/ABCB1 no desenvolvimento da doença de Alzheimer (LAM *et al.* 2001; CIRRITO *et al.* 2005), na insuficiência renal aguda (HUANG *et al.*, 2000) e na colite ulcerativa (HO e cols, 2006).

Tabela 1. Expressão e localização da proteína Pgp/ABCB1

Tecido / células	Localização	Referências
rim	apical	Fojo <i>et al.</i> , 1987; Thiebaut <i>et al.</i> , 1987; Leslie <i>et al.</i> , 2005
intestino	apical	Fojo <i>et al.</i> , 1987; Thiebaut <i>et al.</i> , 1987; Leslie <i>et al.</i> , 2005
figado	apical	Fojo <i>et al.</i> , 1987; Thiebaut <i>et al.</i> , 1987; Leslie <i>et al.</i> , 2005
barreira hemato-encefálica	apical	Fojo <i>et al.</i> , 1987; Thiebaut <i>et al.</i> , 1989; Leslie <i>et al.</i> , 2005
barreira hemato-fluido cerebroespinhal	apical	Rao <i>et al.</i> , 1999; Leslie <i>et al.</i> , 2005
barreira hemato-testicular	apical	Thiebaut <i>et al.</i> , 1989; Cordon-Cardo <i>et al.</i> 1989; Leslie <i>et al.</i> , 2005
células hematopoiéticas	-	Chaudhary e Roninson., 1991; Chaudhary <i>et al.</i> , 1992
linfócitos	-	Chaudhary e Roninson., 1991; Chaudhary <i>et al.</i> , 1992
macrófagos	-	Fisher <i>et al.</i> , 1996

1.2.3 Importância da Pgp/ABCB1 na Quimioterapia

Muitos quimioterápicos com alvos intracelulares utilizados no tratamento do câncer, principalmente os da classe dos alcalóides da vinca, epipodofilotoxinas, taxóis e antraciclinas são substratos da Pgp/ABCB1. Como este vasto espectro de drogas contra o câncer é transportado pela Pgp/ABCB1, e devido à existência de tumores resistentes a múltiplas drogas na clínica, vários investigadores buscaram identificar a atividade e a expressão da Pgp/ABCB1 em tecidos tumorais. Em 1996, Goldstein revisou a expressão da Pgp/ABCB1 em tumores. Ficou constatado que tumores que, freqüentemente, expressam altos níveis de RNAm de *MDR1/ABCB1* antes de receberem tratamento quimioterápico (intrinsecamente resistentes) incluem o câncer de cólon, o carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma adrenocortical, feocromocitoma, células tumorais das ilhotas pancreáticas e tumores carcinóides. Clinicamente, estes tumores são resistentes à quimioterapia e muitos são derivados de tecidos que normalmente expressam o gene *MDR1/ABCB1*. Outros carcinomas também mostram níveis de RNA de *MDR1/ABCB1* elevados ou intermediários antes de qualquer tratamento. Este grupo inclui a leucemia, a leucemia crônica, o linfoma não-Hodgkins, a leucemia mielocítica crônica em crise blástica, o neuroblastoma e o astrocitoma. Existem ainda cânceres que são inicialmente sensíveis à quimioterapia, mas que podem adquirir resistência durante ou depois da terapia. Como cânceres que adquirem altos níveis de

RNA_m de MDR1/ABCB1 após a exposição a uma droga incluem-se o linfoma não-Hodgkins, a leucemia linfoblástica em adultos e crianças, a leucemia mielóide aguda em adultos, o neuroblastoma, o feocromocitoma, o câncer de mama, o câncer de ovário, o rabdomiosarcoma, o sarcoma pediátrico e o mieloma múltiplo.

Gottesman (2002a) reuniu evidências de que a Pgp/ABCB1 desempenha um papel significativo na clínica, mais especificamente na quimioterapia do câncer. Ele cita os seguintes motivos para tal: níveis de expressão da Pgp/ABCB1 em diversos tumores são elevados o suficiente para conferir uma significativa resistência a drogas; a aquisição de resistência a drogas após a quimioterapia está associada com o aumento dos níveis de Pgp/ABCB1; a expressão aguda de Pgp/ABCB1 tem sido observada em tumores humanos após a exposição *in vivo* à doxorubicina; a expressão da Pgp/ABCB1 em alguns tumores prediz a pobre resposta à quimioterapia com drogas que são transportadas pela Pgp/ABCB1.

Outro exemplo do envolvimento da Pgp/ABCB1 na clínica é relacionado ao tratamento da AIDS. A proteína é capaz de transportar agentes inibidores de proteases, uma das classes de quimioterápicos utilizada no tratamento da AIDS capazes de mimetizar os substratos das proteases, impedindo a formação do vírus. A Pgp/ABCB1 é expressa em células alvo da infecção por HIV, como células T (CD4⁺) e macrófagos, e é possível que a resistência a múltiplas drogas que ocorre no tratamento do AIDS tenha a contribuição da atividade da Pgp/ABCB1 nas células alvo do tratamento (SRINIVAS *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1998). Além disso, a Pgp/ABCB1 influencia na baixa biodisponibilidade dos inibidores de protease quando administrados via oral, devido à sua expressão no intestino e rim, e é uma das responsáveis pela baixa concentração de drogas observadas no cérebro e testículo, que se tornam sítios de replicação viral, conferindo resistência ao tratamento (MIZUNO *et al.*, 2003; PARK e SINKO, 2005).

1.3 PROTEÍNA ASSOCIADA A RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (MRP1/ABCC1)

1.3.1 Descoberta e caracterização

O caminho da identificação da MRP1/ABCC1 e a identificação do seu gene seguem o rastro da descoberta e caracterização da proteína Pgp/ABCB1.

McGrath e Center (1987) observaram que uma linhagem de leucemia mielóide resistente a múltiplas drogas, obtida por seleção química com adriamicina (HL60/ADR), não expressava a Pgp/ABCB1. Ainda em 1987, Mirski *et al.* obtiveram, através da seleção química com a adriamicina, uma linhagem de “small lung cancer cells” resistente a múltiplas drogas (H69 AR), e não detectaram a expressão da Pgp/ABCB1 nesta linhagem celular, com o uso de anticorpo. Versantvoort *et al.* (1992) mostraram que as linhagens SW-173/2R120 (“non-small lung cancer cells”) e a GLC4/ADR (“small lung cancer cells”), consideradas células resistentes a múltiplas drogas, tinham menor acúmulo de daunorubicina que as respectivas linhagens parentais. Essas linhagens tinham aumento de efluxo de daunorubicina dependente de energia, mas não expressavam a Pgp/ABCB1, sugerindo a existência de outra proteína capaz de realizar o efluxo.

Diante da evidência da possível existência de um outro transportador de substâncias, diferente da Pgp/ABCB1, Cole *et al.* (1992) estudaram a linhagem H69 AR de “small lung cancer cells” e identificaram a amplificação de uma seqüência gênica como sendo responsável pelo fenótipo MDR nesta linhagem. O RNAm para o qual esta seqüência codificava estava aumentado também em outra linhagem MDR [HeLa J(2)R] que não superexpressava a Pgp/ABCB1. O sequenciamento do cDNA para esta região amplificada revelou um gene que codificava para uma proteína, que foi denominada Proteína Associada a Resistência a Múltiplas Drogas (MRP). A análise desta seqüência permitiu, também, a classificação da

MRP como membro da superfamília ABC de transportadores transmembrana dependentes de energia, e identificou duas regiões para ligação com nucleotídeo.

Após a descoberta da MRP, outras proteínas homólogas foram descobertas e classificadas como membros da mesma família. Esta família passou a ser chamada de família MRP de transportadores e a MRP passou a ser chamada de MRP1. Posteriormente, por ser membro da superfamília transportadores ABC, a MRP1 recebeu uma nova nomenclatura, sendo chamada ABCC1. Nesta dissertação esta proteína será referida como MRP1/ABCC1 (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>).

Outros estudos subseqüentes ao trabalho de Cole *et al.* (1992) visaram entender o mecanismo pelo qual a MRP1/ABCC1 causava resistência a múltiplas drogas em linhagens que a superexpressavam.

Schneider *et al.* (1994) confirmaram a correlação entre a superexpressão do gene para MRP1/ABCC1 e a redução do acúmulo intracelular de drogas e do aumento do efluxo de drogas na linhagem resistente a múltiplas drogas MCF7/VP (câncer humano de mama) que não expressava Pgp/ABCB1. Grant *et al.* (1994) estudaram a superexpressão da proteína MRP1/ABCC1 relacionando-a com a resistência a múltiplas drogas. Neste trabalho os autores desenvolveram um anticorpo para a detecção do produto do gene *MRP1/ABCC1*. Este anticorpo reconheceu uma proteína integral de membrana, glicosilada e com o peso molecular aparente de 190kDa, concordando com o peso molecular predito pela análise da seqüência primária dos aminoácidos do gene *MRP1/ABCC1*. Células HeLa foram transfectadas com o gene *MRP1/ABCC1* e os níveis de seus RNAm e proteína foram medidos e comparados com a resistência adquirida por esta linhagem. A correlação foi positiva, atribuindo à superexpressão de MRP1/ABCC1 a resistência obtida.

Cole *et al.* (1994) mostraram que a linhagem celular HeLa transfectada com o gene *MRP1/ABCC1* adquire resistência aos quimioterápicos doxorubicina, daunorubicina,

epirubicina, vincristina, etoposídeo e colchicina. Além disso, os autores mostraram que as células da linhagem transfectada apresentaram acúmulo reduzido e efluxo aumentado de vincristina radioativa, sendo estes fenômenos dependentes de energia.

Finalmente, Zaman *et al.* (1994) caracterizaram a MRP1/ABCC1 como uma bomba de efluxo presente na membrana plasmática. Para chegarem a esta conclusão, a linhagem de carcinoma de pulmão SW-1573/S1 foi transfectada com o gene para MRP1/ABCC1. A linhagem obtida [S1(MRP)] superexpressava MRP1/ABCC1. Usando um anticorpo contra a MRP1/ABCC1 eles obtiveram a marcação de MRP1/ABCC1 na membrana plasmática e no citosol destas células. Esta linhagem mostrou resistência a diversas drogas como a doxorubicina, daunorubicina, vincristina e etoposídeo para as quais o acúmulo intracelular estava diminuído em relação à linhagem parental.

Além dos quimioterápicos, outros substratos para transporte pela MRP1/ABCC1 foram estudados. Jedlitschky *et al.* (1994) caracterizaram o transporte do leucotrieno C₄ (LTC₄, um conjugado à glutathiona endógeno) pela MRP1/ABCC1. Utilizando vesículas das membranas de células resistentes a múltiplas drogas HL60/ADR (leucemia mielóide humana, obtidas por seleção química), que superexpressam MRP1/ABCC1, os autores mostraram que o LTC₄ é transportado para o interior destas vesículas de forma dependente de energia. O mesmo resultado foi obtido para o transporte de glutathiona S-(2,4-dinitrofenil) (DNP-SG). Leier *et al.* (1994) também mostraram que a MRP1/ABCC1 é capaz de transportar DNP-SG e LTC₄, leucotrieno D₄ e leucotrieno E₄. Neste estudo, as vesículas de membranas foram obtidas de células HeLa transfectadas com o gene *MRP1/ABCC1*. Outra observação deste estudo é de que o transporte de LTC₄, além de ser dependente de ATP, foi inibido pelo MK571, antagonista do receptor de LTD₄. Müller *et al.* (1994), também utilizando vesículas de membrana plasmática, mas das células GLC4/ADR e S1(MRP), mostraram o transporte de

LTC₄ e DNP-SG dependente de ATP. Além disso, este transporte foi inibido por glutathiona oxidada (GSSG), vincristina, vinblastina e vanadato.

Jedlitschky *et al.* (1996) utilizaram vesículas de membranas de células HeLa transfetadas com o gene *MRP1/ABCC1* (HeLa T5) e caracterizaram o transporte de conjugados de glutathiona, de glucoronídeo e de sulfato, dentre eles o conjugado a glucoronídeo da droga anticâncer etoposídeo e o conjugado a glutathiona da droga anticancer mefalan. Este estudo também mostrou o transporte de estradiol 17 β -glucoronosil e glutathiona oxidada (GSSG) pela MRP1/ABCC1.

Visando estabelecer a correlação entre o transporte de conjugados à glutathiona e mecanismos de resistência a drogas mediados por glutathiona, Shen *et al.* (1996), utilizando vesículas de membranas de HL60/ADR, mostraram que doxorubicina, vincristina, e etoposídeo competem com o transporte de um conjugado a glutathiona (azidofenacilglutathiona – APA-SG). GSSG, DNP-SG, MK571 também foram capazes de inibir este transporte. Outro dado deste estudo é que as células NIH 3T3 transfetadas com o gene *MRP1/ABCC1* realizam o efluxo da sonda monoclorobimane (MCB), que fluoresce ao ser conjugado a glutathiona.

Zaman *et al.* (1995) mostraram que na linhagem S1(MRP) a depleção dos níveis intracelulares de glutathiona (GSH) pela butionina sulfoximina (BSO), um inibidor da síntese de GSH, reverteu completamente a resistência a daunorubicina, doxorubicina, vincristina e etoposídeo. A depleção de GSH também diminuiu o efluxo de daunorubicina. Estes resultados mostraram o funcionamento da MRP1/ABCC1 como um carreador de drogas dependente de GSH. Como estas drogas não formam conjugados a GSH, foi sugerido o mecanismo de co-transporte de drogas com GSH para explicar o transporte realizado pela MRP1/ABCC1.

Investigações posteriores confirmaram esta hipótese. Rappa *et al.* (1997) mostraram que células tronco embrionárias de camundongo que expressam MRP1/ABCC1 realizam extrusão de GSH e que a concentração de GSH extracelular aumentou e a intracelular

diminuiu, de forma proporcional, na presença de etoposídeo. Loe *et al.* (1998) mostraram que membranas de células HeLa T14 transfectadas com MRP1/ABCC1 e membranas de células HL60/ADR só foram capazes de realizar o transporte de vincristina na presença de GSH. Além disso, a vincristina aumentou o acúmulo de GSH em vesículas de HeLa T14 e somente na presença de vincristina e GSH o transporte de LTC₄ para o interior das vesículas foi inibido.

Kruh *et al.* (1999) revisaram a capacidade de transporte da MRP1/ABCC1. De forma geral, a MRP1/ABCC1 transporta substâncias hidrofóbicas, aniônicas (em co-transporte com GSH ou não) e ânions orgânicos conjugados com glutathione, com glucoronídeo e com sulfato.

1.3.2 Importância da MRP1/ABCC1 na Fisiologia e Fisiopatologia

Cole *et al.* (1992) estudaram a expressão do RNAm da MRP1/ABCC1 em tecidos normais e detectaram sua expressão no pulmão, testículo e células mononucleares de sangue periférico. Além destes tecidos, Zaman *et al.* (1993) detectaram a expressão de RNAm da MRP1/ABCC1 na placenta, cérebro, rim, duodeno, cólon, bexiga, baço, glândula adrenal e músculo. Abbaszadegan *et al.* (1994) mostraram a expressão basal de MRP1/ABCC1 em células de sangue periférico (CD4, CD8, CD14, CD15, CD19, CD56) e células hematopoiéticas do sangue periférico e medula óssea. Em 1996, Flens *et al.* detectaram a expressão da proteína MRP1/ABCC1 por “immunoblot” de membranas de tecidos humanos. Os maiores níveis de MRP1/ABCC1 foram encontrados na glândula adrenal, pulmão, coração e músculo esquelético. Níveis menores foram detectados no fígado, baço, rim e eritrócitos. A detecção de MRP1/ABCC1 por imunohistoquímica revelou altos níveis nas glândulas sudoríparas, glândulas salivares, esôfago, estômago, intestino grosso e delgado, bronquíolos pulmonares e macrófagos pulmonares, testículo, ovário e placenta, linfócitos, coração, córtex

da adrenal, pâncreas e tecido muscular esquelético e liso. Baixos níveis foram encontrados nos hepatócitos, rim, útero e bexiga.

O grande número de tecidos normais que expressam MRP1/ABCC1 sugere um papel fisiológico para esta proteína (Tabela 2). Visando estudar esse papel fisiológico, foram desenvolvidos animais “knockout” para MRP1/ABCC1. Wijnholds e cols (1997) mostraram que a quantidade de LTC₄ secretada por mastócitos derivados de medula óssea de animais *mrp1* (-/-) é reduzida, que a quantidade de LTC₄ intracelular está aumentada em comparação com animais *mrp1* (+/+) e que não houve diferença nos níveis de leucotrieno B₄. Além disso, a resposta inflamatória foi diminuída em indução de edema na orelha dos animais por ácido aracônico. Para testar a contribuição da MRP1/ABCC1 para a toxicidade de drogas, os mastócitos derivados da medula óssea de animais *mrp1* (-/-) e *mrp1* (+/+) foram tratados com a substância citotóxica etoposídeo e o resultado mostrou a inibição do crescimento, por exclusão de azul de tripan, quatro vezes maior em células *mrp1* (-/-) que em células *mrp1* (+/+). A sobrevivência dos animais ao tratamento com etoposídeo também foi testada, e os animais *mrp1* (-/-) tiveram sobrevivência menor que os animais *mrp1* (+/+). Lorico *et al.* (1997) também mostraram menor sobrevivência de animais *mrp1* (-/-) tratados com etoposídeo. Além disso, mostraram níveis aumentados de GSH em vários tecidos dos animais *mrp1* (-/-) tais como mama, pulmão, timo, coração, cólon, músculo, testículo, ovário e eritrócito. A glutamil cisteína sintetase (γ -GCS), enzima que sintetiza o GSH, não teve sua atividade alterada, mostrando que o aumento de GSH não foi devido ao aumento da sua síntese e levantando a possibilidade de que a deficiência na exportação de GSH mediada por MRP1/ABCC1 seja a causadora do aumento de GSH nos tecidos.

Wijnholds *et al.* (1998), visando entender melhor a toxicidade para o etoposídeo em animais *mrp1* (-/-), analisaram as lesões teciduais causadas pelo tratamento com esta droga e encontraram lesões na mucosa da orofaringe e nos túbulos seminíferos dos testículos. Além

disso, foi constatada poliúria (diabetes insipidus) nos animais *mrp1* (-/-) tratados com etoposídeo. Rao *et al.* (1999) mostraram a expressão de MRP1/ABCC1 na superfície basolateral do epitélio do plexo coróide de humanos e ratos. Wijnholds *et al.* (2000) compararam animais “knockout” para *mdr1a* e *mdr1b* (DKO) e animais “knockout” para *mdr1a*, *mdr1b* e *mrp1* (TKO). O acúmulo de etoposídeo no plexo coróide foi maior nos animais TKO provando que o epitélio do PC, que possui MRP1/ABCC1, atua como uma barreira para drogas vindo do sangue (barreira sangue - fluido cerebrospinal).

Tabela 2. Expressão e localização da proteína MRP1/ABCC1

Tecido/células	Localização	Referências
rim	basolateral	Zaman <i>et al.</i> , 1993; Flens <i>et al.</i> 1996; Wijnholds <i>et al.</i> , 1998; Leslie <i>et al.</i> , 2005
barreira hemato-encefálica	apical	Zaman <i>et al.</i> , 1993; Wijnholds <i>et al.</i> , 1997; Leslie <i>et al.</i> , 2005
barreira hemato-fluido cerebrospinal	basolateral	Rao <i>et al.</i> 1999; Leslie <i>et al.</i> , 2005
barreira hemato-testicular	basolateral	Cole <i>et al.</i> , 1992; Flens <i>et al.</i> 1996; Wijnholds <i>et al.</i> , 1998; Leslie <i>et al.</i> , 2005
células hematopoiéticas	-	Abbaszadegan <i>et al.</i> 1994; Lorico <i>et al.</i> , 1997
linfócitos	-	Cole <i>et al.</i> , 1992; Abbaszadegan <i>et al.</i> , 1994; Flens <i>et al.</i> , 1996
macrófagos	-	Flens <i>et al.</i> , 1996

O papel fisiopatológico da MRP1/ABCC1 parece estar relacionado à sua atividade de transporte de GSH e GSSG e à regulação do balanço redox. Em células endoteliais, a MRP1/ABCC1 atua na regulação do estresse oxidativo em resposta a estímulo mecânico. As células endoteliais exportam GSSG durante o estresse oxidativo causado pelo fluxo sanguíneo oscilatório. Este transporte predispõe as células endoteliais a apoptose, contribuindo para a formação de lesão aterosclerótica. A inibição da MRP1/ABCC1 permite às células endoteliais manter seu potencial redox intracelular e promove efeitos benéficos na sobrevivência e função das células endoteliais (MUELLER *et al.*, 2005). A regulação do estado oxidativo intracelular pela MRP1/ABCC1 também parece estar envolvida no progresso da infecção por HIV. A MRP1/ABCC1 é expressa em macrófagos e linfócitos T e durante a infecção com HIV a expressão da MRP1/ABCC1 em macrófagos aumenta. A atividade da MRP1/ABCC1 está

relacionada com o aumento da infecção por HIV, visto que inibidores da atividade da MRP1/ABCC1 são capazes de reduzir a infecção por HIV. A provável explicação para os efeitos observados com a utilização dos inibidores é que a inibição de MRP1/ABCC1 pode estar aumentando os níveis intracelulares de GSH diminuindo a replicação viral, já que esta parece ser regulada pelos níveis intracelulares de radicais livres. (KALEBIC *et al.*, 1991; HERZENBERG *et al.*, 1997; SPECK *et al.*, 2002; LUCIA *et al.*, 2005).

1.3.3 Importância da MRP1/ABCC1 na Quimioterapia

A expressão e a atividade da MRP1/ABCC1 está associada com a dificuldade no tratamento de tumores como o câncer de mama, de estômago, neuroblastoma, retinoblastoma, câncer de pulmão, carcinoma endometrial, leucemia mielóide aguda e leucemia de células T, entre outros (YOUNG *et al.*, 1999, YOUNG *et al.*, 2001). Outra doença na qual a resistência a múltiplas drogas conferida pela MRP1/ABCC1 tem sido investigada é a AIDS. A MRP1/ABCC1 é expressa e está ativa em macrófagos e linfócitos T infectados com HIV e é capaz de transportar inibidores de protease utilizados nos tratamentos, tais como, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, diminuindo o acúmulo destas drogas nas células alvo (SRINIVAS *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 2001; VAN DER SANDT *et al.*, 2001; JORAJURIA *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVAS & OBJETIVOS

Sabendo que a Pgp/ABCB1 e a MRP1/ABCC1 possuem um papel relevante na fisiologia normal, na fisiopatologia e na quimioterapia, que a inibição da atividade destas proteínas tem consequências importantes na fisiologia normal, na fisiopatologia e na quimioterapia e que nenhum estudo investigou se o AO é capaz de inibir a atividade de transporte da Pgp/ABCB1 e da MRP1/ABCC1; os objetivos desta dissertação foram:

- Investigar se o AO é capaz de inibir a atividade de transporte da Pgp/ABCB1
- Investigar se o AO é capaz de inibir a atividade de transporte da MRP1/ABCC1
- Caracterizar se a inibição é reversível ou irreversível
- Investigar se o AO é substrato para a MRP1/ABCC1

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Soluções e reagentes

Meio de Cultura - meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com alta concentração de glicose. O meio de cultura era preparado da seguinte forma (em g/L de solução): 13,4 DMEM (Gibco); 0,2 NaHCO₃ (Reagen, Brasil); 3,0 HEPES (Promega, USA). Foi adicionada água Milli-Q q.s.p. 1litro. A solução teve o pH ajustado para 7,4, utilizando NaOH ou HCl 1N.

Solução salina tamponada (PBS) - o PBS era preparado da seguinte forma em g/L de solução: 8,0 NaCl (Reagen, Brasil); 0,2 KCl (Vetec, Brasil); 1,15 Na₂HPO₄·7H₂O (Vetec, Brasil); 0,2 NaH₂PO₄·H₂O (Reagen, Brasil). Foi adicionada água Milli-Q q.s.p. 1litro. A solução teve o pH ajustado para 7,4, utilizando NaOH ou HCl.

Soro fetal bovino (SFB) - fornecido por GIBCO (Grã Bretanha). Inativado a 56°C e mantido a -20°C até o uso. Sua utilização no meio de cultura foi feita a 10% (v/v).

Tripsina - A solução foi preparada da seguinte forma: 0,125g Tripsina (Sigma, USA); 0,02g EDTA (Reagen, Brasil) diluídos em 100ml de PBS. O estoque desta solução foi mantido a -20°C. Durante o uso a solução foi mantida a 4°C.

Dimetilsulfóxido (DMSO) – fornecido por Sigma (USA) – utilizado sem diluição.

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

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

5,(6)-carboxifluoresceína diacetato (CFDA) – fornecido pela Molecular Probes (USA). Solução estoque de 10mM diluída em DMSO.

MK571 – fornecido por Alexis Biochemicals (Suíça). Solução estoque de 10mM diluída em DMSO e mantida a -20°C.

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

Ácido Oleanólico – O triterpeno ácido oleanólico foi extraído de frutas de *Licania tomentosa* Bench, espécie de planta da família Chrysobalanace (extração realizada pelas doutoras Maria Auxiliadora Coelho Kaplan e Rachel Oliveira Castilho no Núcleo de Produtos Naturais da UFRJ). A *Licania tomentosa* foi coletada na cidade do Rio de Janeiro, RJ e identificada pela Dra Rosa Fuks do Jardim Botânico, registradas no Herbarium do Museu Nacional, UFRJ, pelo número R195941. As frutas foram trituradas em moinhos de faca, o material extraído com metanol até o esgotamento e o extrato obtido foi seco sob pressão reduzida em evaporador rotatório. A seguir o extrato seco foi ressuspensão em H₂O:MeOH (9:1), e submetido a partições sucessivas com hexano, diclorometano e acetato de etila. A fração em acetato de etila (AcOEt) foi cromatografada em coluna de sílica-gel, utilizando-se como eluente misturas de hexano, acetato de etila e metanol, em gradiente de polaridade crescente além dos solventes puros, obtendo-se 75 frações que foram reunidas segundo perfil cromatográfico em camada fina. O material resultante da reunião das frações 18-21, eluídas em Hex/AcOEt 30% foi analisado por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrofotometria de massa e por espectrofotometria de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, APT sendo identificado como o ácido oleanólico (CASTILHO, 2001). Para uso, uma solução estoque de AO foi preparada em DMSO (1mg de AO em 100µl de DMSO) e esta solução foi posteriormente diluída em DMEM sem soro nas concentrações a serem utilizadas em cada experimento.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA

Para a avaliação do efeito do AO sobre a atividade das proteínas Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1 foi utilizada a linhagem celular Ma104. Esta linhagem epitelial é derivada de rim de embrião de macaco rhesus. A escolha da Ma104 para este estudo se deve ao fato dela ser uma linhagem resistente a múltiplas drogas que expressa, constitutivamente, Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1 (CAPELLA *et al.*, 1999; CAPELLA *et al.*, 2001).

As células Ma104 foram crescidas em meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB), em garrafas de poliestireno (25 ou 75 cm²), a 37°C. As células foram subcultivadas utilizando tripsina a cada 2-3 dias. Para cada experimento foram utilizadas garrafas de células semiconfluentes e as mesmas condições de meio e soro.

3.2.2 MEDIDA DE ATIVIDADE DE Pgp/ABCB1 E MRP1/ABCC1

A concentração intracelular de uma droga influencia na sua citotoxicidade. O conteúdo intracelular de uma droga é uma função da quantidade de droga que entra nas células (influxo) e a quantidade de droga expelida pelas células (efluxo). Como visto na introdução desta dissertação, a relação “influxo/efluxo” de algumas drogas é alterada pelas proteínas. Os inibidores da atividade destas proteínas impedem ou diminuem a extrusão de drogas, aumentando o acúmulo intracelular e revertendo o fenótipo de resistência (KRISHAN, 1997a).

Experimentalmente uma das formas para se medir a inibição da atividade da Pgp/ABCB1 ou MRP1/ABCC1 é pela análise do acúmulo intracelular de sondas fluorescentes, que são substratos para estas proteínas, por citometria de fluxo (que consegue medir os níveis de fluorescência intracelulares).

3.2.2.a Rodamina 123 -sonda para medir atividade Pgp/ABCB1

A sonda fluorescente utilizada para medir a atividade de transporte da Pgp/ABCB1 foi a Rodamina 123 (Ro123). A Ro123 é uma molécula catiônica e lipofílica, e a Ro123 é capaz de difundir-se livremente através da membrana plasmática para dentro das células (PETRIZ e GARCIA-LOPEZ, 1997), e é considerada um substrato clássico para o transporte realizado pela Pgp/ABCB1 (LAMPIDIS *et al.*, 1985; NEYFAKH, 1988).

3.2.2.b 5,(6)-Carboxifluoresceína - sonda para medir atividade de MRP1/ABCC1

A sonda fluorescente utilizada para medir a atividade de transporte da MRP1/ABCC1 foi a 5,(6)-carboxifluoresceína (CF). No entanto, apesar de ser um substrato aniônico para a MRP1/ABCC1, a membrana plasmática é impermeável a CF e esta característica dificulta a sua utilização direta. Para contornar este obstáculo, utiliza-se um precursor de CF para o qual a membrana plasmática é permeável, a 5,(6)-carboxifluoresceína diacetato (CFDA). O CFDA, além de difundir-se livremente através da membrana plasmática para dentro das células, é uma substância não fluorescente e eletricamente neutra. No meio intracelular, a CFDA é hidrolisada por esterases não específicas, dando origem ao seu produto fluorescente aniônico, a CF. Para a maioria das células, a hidrólise por esterases intracelulares não é um passo limitante para o acúmulo de CF (BREEUWER *et al.*, 1995).

3.2.2.c Ciclosporina A (CSA) - inibidor da atividade da Pgp/ABCB1

A Ciclosporina A (CSA) é um reversor do fenótipo MDR conferido pela atividade transportadora da Pgp/ABCB1 (BOSH *et al.*, 1997; KÜNEL *et al.*, 1997; LEGRAND *et al.*, 1998; NASCIMENTO *et al.*, 2004). Quimicamente é um polipeptídeo cíclico de 11 aminoácidos, altamente lipofílico.

3.2.2.d MK571 - inibidor da atividade da MRP1/ABCC1

O MK571 foi, inicialmente, descrito como um antagonista de receptor de leucotrieno D₄ (GEKELER *et al.*, 1995) e, posteriormente, foi descoberta sua capacidade de inibir a atividade da MRP1/ABCC1 sendo, então, o MK571 considerado um potente inibidor da atividade da MRP1/ABCC1 (LEIER *et al.*, 1994a; LEIER *et al.*, 1994b; VAN DER KOLK *et al.*, 1998).

3.2.2.e Protocolos de medida de atividade das proteínas Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1

As células Ma104 foram cultivadas em placas de 24 poços, sendo plaqueadas, 24 horas antes da realização de cada experimento numa concentração de 1×10^5 cel/ml (1ml por poço) e mantidas em estufa a 37°C. Antes do início de cada experimento as células foram lavados duas vezes com 500µl de PBS e ao final dos experimentos as células foram lavadas com 500µl de PBS e foram incubadas com 200µl de tripsina por 3-10 minutos, até que as células se soltassem do fundo da placa. As células foram recolhidas e transferidas para tubos de leitura no citômetro, mantidos em gelo (aproximadamente 4°C) até a realização das leituras de fluorescência intracelular por citometria de fluxo. As leituras foram feitas até, no máximo, 30 minutos depois e foram realizadas com a excitação das amostras por laser de argônio ajustado para emitir 15 mW a 488 nm em um citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, EUA). A fluorescência da Ro123 e da CF foi medida através de um filtro “band-pass” 530nm (FL-1). A intensidade de fluorescência de 10000 eventos individuais (células) foi medida, resultando em um histograma em escala logarítmica (unidade arbitrária – u.a.). Para a análise numérica de cada experimento foram utilizadas as médias geométricas da intensidade de fluorescência (MIF) dos 10000 eventos.

3.2.2.f Curva temporal de acúmulo de Ro123

As células foram incubadas com 200ng/ml de Ro123 por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos (volume final em cada poço - 200µl de meio sem soro).

3.2.2.g Efeito da CSA sobre o acúmulo de Ro123

As células foram incubadas por 30 minutos com 200ng/ml de Ro123 na ausência de CSA ou na presença de CSA na concentração 1µM (volume final em cada poço - 200µl de meio sem soro).

3.2.2.h Curva temporal de acúmulo de CF

As células foram incubadas com 2µM de CFDA (volume final em cada poço - 200µl de meio sem soro) por 5,15,30,60,120 e 180 minutos.

3.2.2.i Curva temporal de extrusão de CF

Todos os poços, exceto o da autofluorescência, foram incubados com 2µM de CFDA (volume final em cada poço - 200µl de meio sem soro) durante 30 minutos. Terminado este tempo, as células foram lavadas com 500µl de PBS e incubadas em 200µl de meio sem soro livre de CFDA por 5, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos.

3.2.2.j Efeito do MK571 sobre o acúmulo de CF

As células foram incubadas por 30 minutos com 2µM de CFDA na ausência ou na presença de MK571 na concentração 25 µM (volume final em cada poço - 200µl de meio sem soro).

3.2.2.k Efeito do MK571 na extrusão de CF

Todos os poços, exceto o da autofluorescência, foram incubados com 2 μ M de CFDA (volume final em cada poço - 200 μ l de meio sem soro) durante 30 minutos. Terminado este tempo as células foram lavadas com 500 μ l de PBS e incubadas por mais trinta minutos em 200 μ l de meio livre de CFDA na presença ou na ausência de 25 μ M de MK571.

3.2.2.l Efeito do AO sobre acúmulo de Ro123

As células foram incubadas por 30 minutos com 200ng/ml de Ro123 na ausência de AO ou na presença de AO nas concentrações 1, 5 e 10 μ g/ml. (volume final em cada poço - 200 μ l de meio sem soro).

3.2.2.m Efeito do AO sobre acúmulo de CF

As células foram incubadas por 30 minutos com 2 μ M de CFDA na ausência de AO ou na presença de AO nas concentrações 1, 5 e 10 μ g/ml (volume final em cada poço - 200 μ l de meio sem soro).

3.2.2.n Efeito de AO sobre a extrusão de CF

Todos os poços, foram incubados com 2 μ M de CFDA (200 μ l de meio sem soro) durante 30 minutos. Terminado este tempo as células foram lavadas com 500 μ l de PBS e incubadas por mais trinta minutos em 200 μ l de meio sem soro livre de CFDA na ausência ou na presença de AO nas concentrações 1, 5, 10 μ g/ml.

3.2.2.o Extrusão de CF após acúmulo de CF na presença de AO.

Todos os poços foram incubados com 2µM de CFDA e 5µg/ml de AO (volume final em cada poço - 200µl de meio sem soro) durante 30 minutos. Terminado este tempo as células foram lavadas com 500µl de PBS e incubadas por mais trinta minutos em 200µl de meio sem soro livre de CFDA na ausência ou na presença de 5µg/ml de AO, exceto o controle para a mediada do nível de fluorescência após o período de acúmulo que só foi submetido a primeiraincubação.

3.2.3 EFEITO DO MK571 SOBRE A TOXICIDADE DO AO

Para a medida de viabilidade celular foi utilizado o método colorimétrico descrito por Mosmann em 1983. O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) é um sal que tem como característica um anel tetrazolium que é clivado por desidrogenases em células metabolicamente ativas, tendo como resultado a formação do cristal de formazana, um produto que tem propriedades colorimétricas. A quantidade final de formazana é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas em uma população homogênea, portanto, consideradas viáveis (MOSMANN, 1983; BERRIDGE *et al.*, 1993).

As células foram plaqueadas a uma concentração de 2×10^5 células/ml, em placas de 96 poços (100µl/poço) e incubadas a 37°C. O experimento foi iniciado 24 horas após o plaqueamento para permitir a adesão das células à placa de cultura.

Cada experimento possuía duas curvas dose-resposta para o AO, uma na presença do MK571 e outra livre de MK571. Para a curva dose-resposta na presença de MK571, às células foram adicionados 100µl de meio com 12,5µM de MK571 na ausência de AO (controle) e na presença de AO nas concentrações 1, 5, 10 µg/ml durante 48 horas a 37°C. Para a curva dose-resposta na ausência de MK571 às células foram adicionados 100µl de meio contendo AO nas concentrações 1 ou 5 ou 10 µg/ml, ou sem conter AO (controle) durante 48 horas a 37°C.

A concentração final de dimetilsulfóxido (DMSO) não excedeu 0,25% em qualquer ponto experimental (concentração sem efeito sobre a viabilidade – dados não mostrados).

Ao final dos tratamentos de 48 horas, 20 µl da solução de MTT (2,5 mg/ml) foram adicionados em cada poço e as células incubadas por 4 horas a 37°C, protegidas de luz. Terminado este tempo, o sobrenadante foi desprezado e os cristais de formazana solubilizados com 150 µl de DMSO.

Após a preparação das amostras, as placas foram levadas para leitura da absorbância a 570nm com filtro de referência a 655nm em um aparelho de ensaio imunoenzimático (ELISA, Benchmark/BioRad) para microplacas. Desta leitura obtiveram-se valores de densidade ótica (D.O.), em unidades arbitrárias (u.a.), para cada ponto experimental. O experimento foi repetido três vezes e feito em triplicata.

3.2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.2.4.a Efeito do AO sobre acúmulo de CF

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da MIF de 4 experimentos. Para a inferência estatística foi realizado um teste de análise de variância (ANOVA) a um fator, pareado e paramétrico, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnett, e foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$

3.2.4.b Efeito de AO sobre a extrusão de CF

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da MIF de 3 experimentos. Para a inferência estatística foi realizado um teste de análise de variância (ANOVA) a um fator, pareado e paramétrico seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnett, e foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$

3.2.4.c Extrusão de CF após acúmulo de CF na presença de AO

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da MIF de 7 experimentos. Para a inferência estatística foi realizado um teste-t (“two-tailed”), pareado e paramétrico. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$

3.2.4.d Efeito do MK571 sobre a toxicidade do AO

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da D.O. de 3 experimentos. Para a inferência estatística foi realizado um teste de análise de variância a dois fatores (“Two-way ANOVA”). O valor de p para a interação foi avaliado e foi considerado significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Para a avaliação do efeito do AO sobre as atividades da Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1 foi necessário validar o modelo experimental. Desta forma, os experimentos a seguir (Figuras 8 a 13) visaram à validação do modelo experimental.

4.1 Curva temporal de acúmulo de 200ng/ml de Ro123

A concentração de Ro123 escolhida para ser utilizada nos experimentos foi 200ng/ml (dados não mostrados). A determinação do tempo para a incubação com a Ro123 foi feita pela escolha de um tempo onde a Ro123 já estivesse em estado de equilíbrio. Para isto foi realizada uma curva temporal de acúmulo de 200 ng/ml de Ro123 (Figura 2).

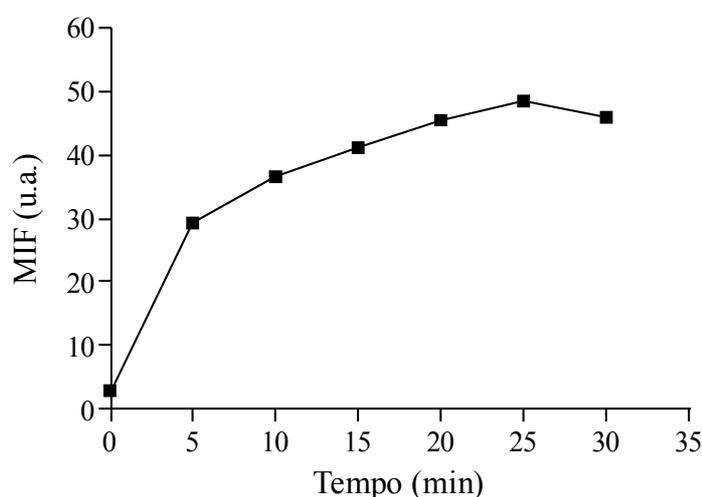


Figura 2. Curva temporal do acúmulo de Ro123 em células Ma104. As células Ma104 foram incubadas com Ro123 (200ng/ml) durante diferentes tempos (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos). Na ordenada está representado a MIF (u.a.) do acúmulo de Ro123. Na abscissa está representado o tempo de incubação com Ro123 em minutos. Os quadrados pretos indicam as médias das MIFs relativas aos tempos medidos (n=2).

A observação do gráfico revela que um estado de equilíbrio é alcançado entre 20 e 30 minutos. Desta forma, o tempo de 30 minutos foi escolhido para a realização dos experimentos do efeito do AO sobre a atividade da Pgp/ABCB1.

4.2 Efeito da CSA sobre o acúmulo de Ro123

Para demonstrar que a CSA, um potente inibidor da atividade de transporte da Pgp/ABCB1, é capaz de aumentar o acúmulo de Ro123 nas células Ma104 (confirmando, portanto, a presença de Pgp/ABCB1 nesta linhagem celular) foram realizados experimentos de acúmulo de Ro123 na presença de CSA (Figura 3).

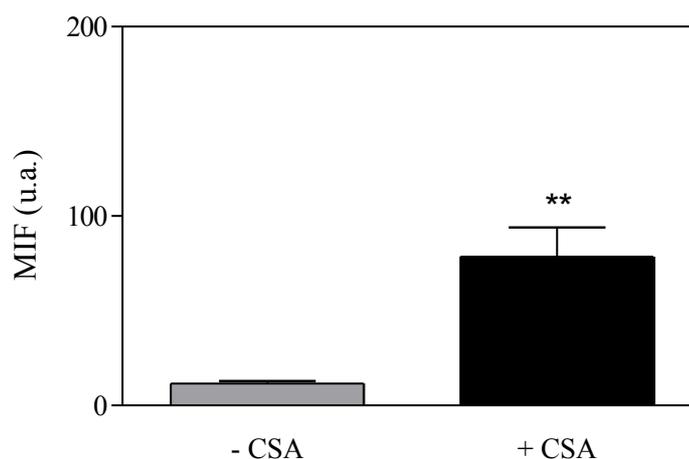


Figura 3. Efeito da CSA sobre o acúmulo de Ro123 em células Ma104. Na ordenada está representado a MIF (u.a.) do acúmulo de Ro123. A condição de acúmulo de Ro123 está representada pelas colunas. Coluna cinza – ausência de CSA. Coluna preta – presença de 1 μ M de CSA. As barras representam \pm erro padrão da média (n=5).

Viu-se que, como esperado, a CSA aumenta significativamente o acúmulo de Ro123 na linhagem celular Ma104. Desta forma, foram confirmados resultados previamente descritos na literatura sobre Ma104 (NASCIMENTO e cols, 2005) e validado este modelo, para as condições experimentais desta dissertação, para a inferência dos efeitos do AO sobre a atividade da Pgp/ABCB1.

4.3 Curva temporal de acúmulo de CF

A concentração de CFDA escolhida para ser utilizada nos experimentos foi 2 μ M (dados não mostrados). Como a CFDA é consumida, durante a incubação, pelas esterases intracelulares, ela deve atingir um estado de equilíbrio influxo-efluxo que não deve se prolongar por tempos muito grandes. Para a visualização deste fenômeno foram realizados experimentos de curva temporal de acúmulo de CF (Figura 4).

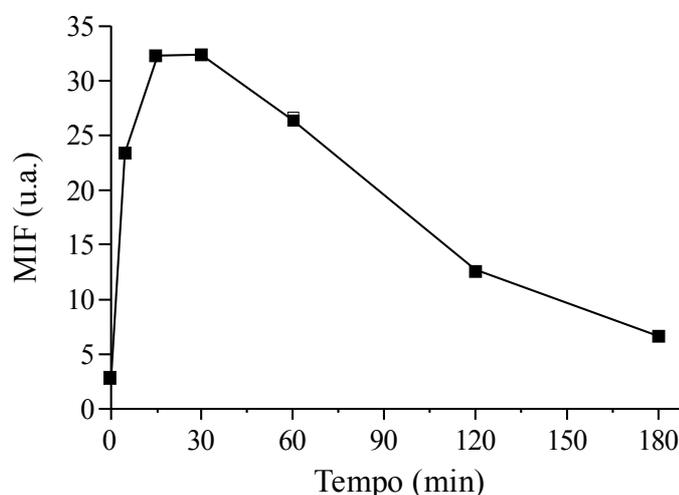


Figura 4. Curva temporal do acúmulo de CF em células Ma104. As células Ma104 foram incubadas com CFDA (2 μ M) durante diferentes tempos (5,15,30,60,120,180 minutos). Na ordenada está representado a MIF (u.a.) do acúmulo de CF. Na abscissa está representado o tempo de incubação com CFDA em minutos. Os quadrados pretos indicam as médias das MIFs relativas aos tempos medidos (n=2).

Como imaginado, pela observação do gráfico vemos que até 15 minutos de incubação com CFDA ocorre um aumento da MIF que se mantém estável até, pelo menos, 30 minutos. Nos tempos maiores (60, 120, 180 minutos) a MIF diminui em relação aos valores máximos obtidos entre 15 e 30 minutos. Os efeitos de aumento, estabilização e diminuição dos valores da MIF podem ser explicados pelas propriedades do sistema CFDA-CF. Ao ser incubada com as células, a CFDA difunde livremente para dentro das células, sendo convertida a CF. A CF

é transportada pela MRP1/ABCC1 e, devido a membrana plasmática ser impermeável a CF, ela não consegue retornar para dentro das células e, com o passar do tempo, a fluorescência intracelular diminui, pois a CFDA do meio vai se esgotando e a CF que está dentro da célula é transportada para fora pela MRP1/ABCC1.

A partir destas observações o período de 30 minutos foi escolhido como o tempo ótimo para a observação do acúmulo de CF para todos os experimentos onde este tratamento foi necessário.

4.4 Curva temporal de extrusão de CF

Este experimento visa observar a cinética de extrusão da CF previamente acumulada em células Ma104. Para isto, as células foram incubadas por 30 minutos com CFDA, lavadas e incubadas novamente em um meio livre de CFDA (Figura 5).

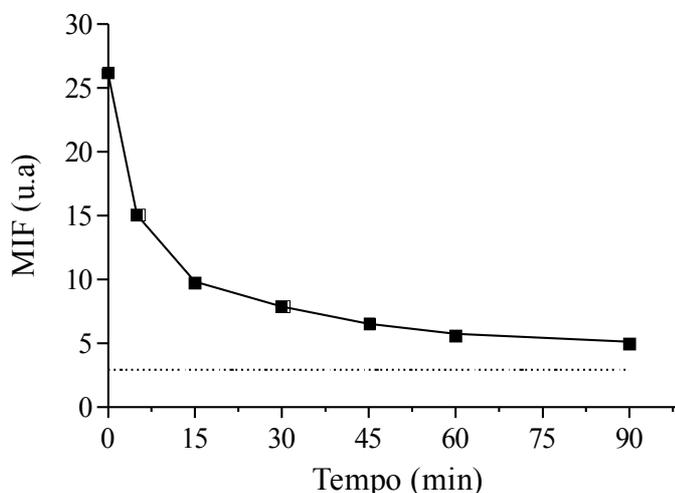


Figura 5. Curva temporal de extrusão de CF em células Ma104. As células Ma104 foram incubadas com CFDA (2 μ M) durante 30 minutos, lavadas e reincubadas em meio livre de CFDA. Na ordenada está representado a MIF (u.a.) do acúmulo de CF. Na abscissa está representado o tempo permitido para a extrusão do CF, em minutos. Os quadrados pretos indicam as médias das MIFs relativas aos tempos medidos (n=2). A linha pontilhada representa o valor de autofluorescência.

A partir desses resultados, pôde-se estabelecer o tempo de 30 minutos para a observação dos efeitos do AO sobre a extrusão da CF. Além disso, pudemos ver que o tempo que as células Ma104 levam para retornar os valores próximos aos de autofluorescência é bem menor na ausência de CFDA (Figura 11) do que com a extrusão na presença de CFDA (Figura 10).

4.5 Efeito do MK571 sobre o acúmulo e a extrusão de CF

Foi visto que as células Ma104 realizam a extrusão da CF acumulada, provavelmente através da MRP1/ABCC1 (Figuras 10 e 11). Sendo o MK571 um potente inibidor da atividade de transporte da MRP1/ABCC1, espera-se que o tratamento com este inibidor durante os períodos de acúmulo e extrusão seja capaz de aumentar o acúmulo e diminuir a velocidade de extrusão em relação a células sem esse tratamento. De fato, as Figuras 6 e 7 mostram que o MK571, como esperado, aumenta significativamente o acúmulo de CF na linhagem celular Ma104 (Figura 6) e inibe a saída de CF da célula, ou seja, inibe a atividade de transporte de CF mediado pela MRP1/ABCC1 (Figura 7).

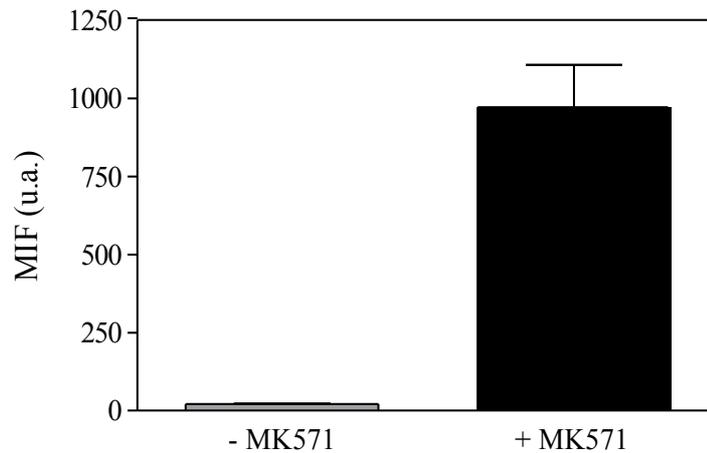


Figura 6. Efeito do MK571 sobre o acúmulo de CF em células Ma104. Na ordenada está representado a MIF (u.a.) do acúmulo de CF. A condição de acúmulo de CF está representada pelas colunas. Coluna cinza – ausência de MK571. Coluna preta – presença de 25uM de Mk571. As barras representam \pm erro padrão da média (n=4).

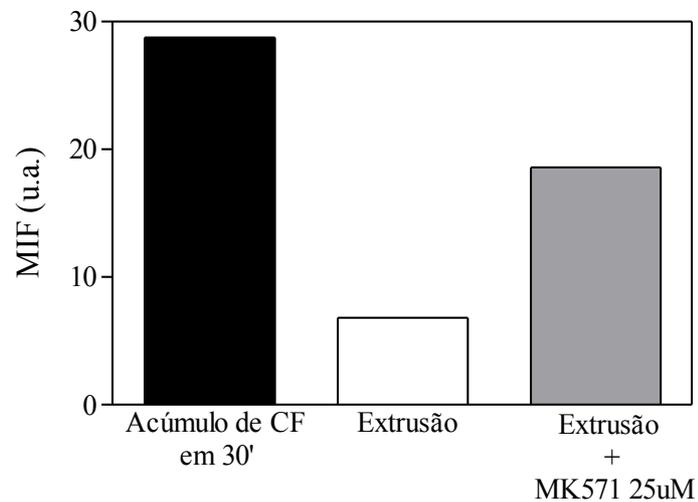


Figura 7. Efeito do MK571 sobre a extrusão de CF em células Ma104. Na ordenada está representado a MIF (u.a.) do acúmulo de CF. A coluna preta representa o de acúmulo de CF após 30 minutos de incubação com 2uM de CFDA. A coluna branca representa a extrusão em 30 minutos de CF realizada em meio livre de CFDA após as células terem acumulado CF por 30 minutos. A coluna cinza representa a extrusão em 30 minutos de CF realizada em meio livre de CFDA mas com 25uM de MK571 após as células terem acumulado CF por 30 minutos.

A demonstração de que o MK571 aumenta o acúmulo de CF e diminui sua extrusão na linhagem Ma104 confirma que esta linhagem expressa MRP1/ABCC1 nas condições experimentais desta dissertação validando a inferência dos efeitos do AO sobre a atividade da MRP1/ABCC1.

Uma vez validado o modelo e otimizadas as condições experimentais, passou-se a estudar o efeito do ácido oleanólico sobre as atividades da Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1.

4.6 Efeito do AO sobre acúmulo de Ro123

Para investigar se o AO é capaz de modular a atividade de transporte da Pgp/ABCB1 nas células Ma104, estas foram incubadas com Ro123 na presença e na ausência do AO (1, 5, 10 µg/ml). Os resultados são mostrados na Figura 8.

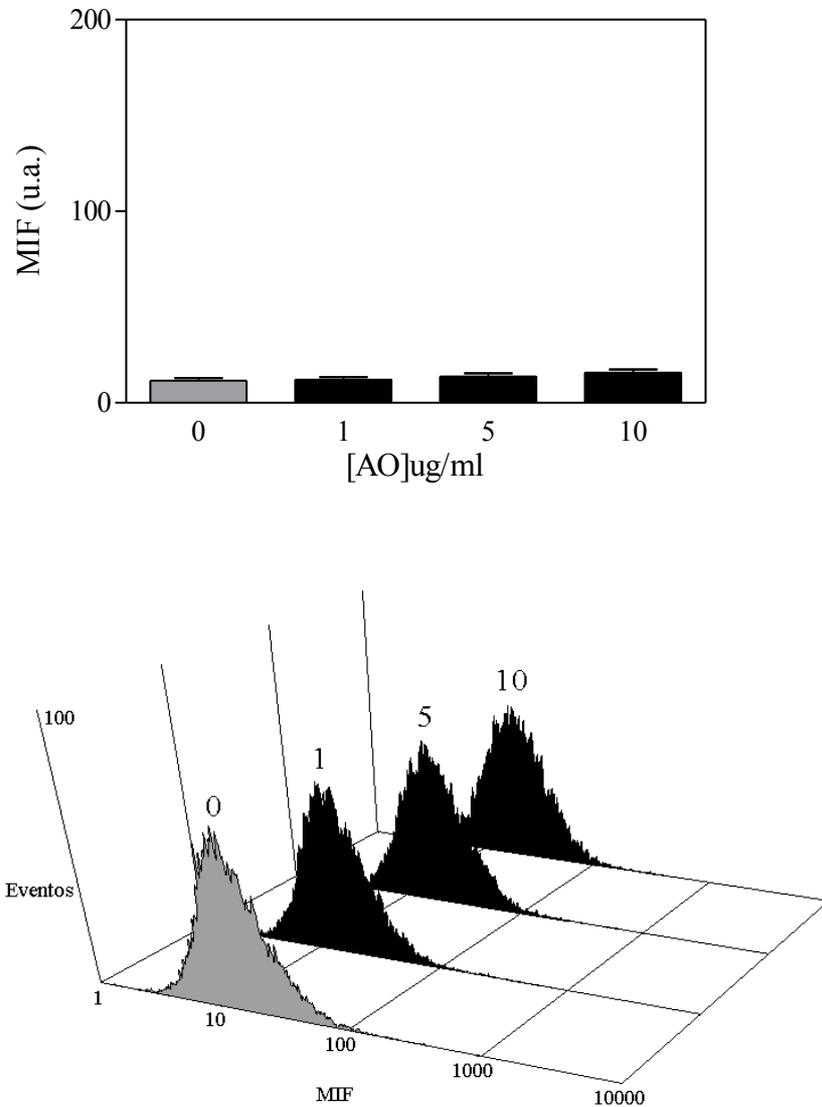


Figura 8. Efeito do AO sobre o acúmulo de Ro123 em células Ma104. (A) Gráfico de colunas. Na ordenada está representado a MIF (u.a.) do acúmulo de Ro123. A condição de acúmulo de Ro123 está representada pelas colunas. Coluna cinza – ausência de AO. Colunas pretas – presença de AO. Os valores indicados abaixo de cada coluna indicam as concentrações de AO utilizadas (0, 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$). As barras representam \pm erro padrão da média ($n=5$). (B) Histogramas de um experimento representativo. Na ordenada está representado o número de eventos. Na abscissa está representada em escala logarítmica a intensidade de fluorescência (u.a.). Os histogramas representam a condição de acúmulo de Ro123. Histograma cinza – ausência de AO. Histogramas pretos – presença de AO. Os valores indicados acima de cada histograma indicam as concentrações de AO utilizadas em $\mu\text{g/ml}$.

Pode-se notar que nenhuma das concentrações de AO utilizadas foi capaz de modular a atividade da Pgp/ABCB1.

4.7 Efeito do AO sobre acúmulo de CF

Para investigar se o AO é capaz modular a atividade de transporte da MRP1/ABCC1 as células Ma104 foram incubadas com CFDA na presença e na ausência do AO (1, 5, 10 ug/ml). Os resultados são mostrados na Figura 9.

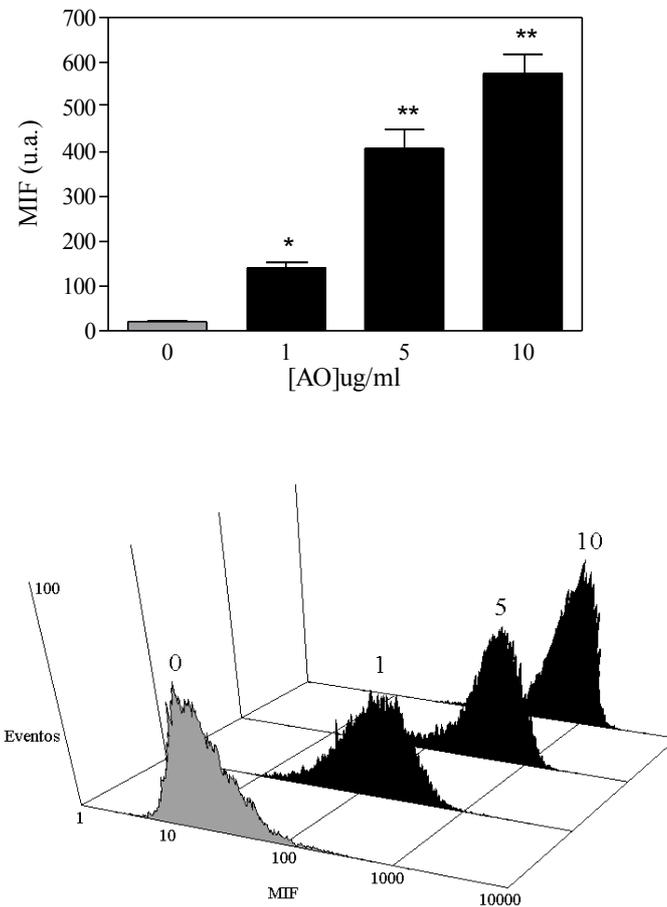


Figura 9. Efeito do AO sobre o acúmulo de CF em células Ma104. (A) Gráfico de colunas ($n=4$). Na ordenada está representado a MIF (u.a.) do acúmulo de CF. A condição de acúmulo de CF está representada pelas colunas. Coluna cinza – ausência de AO. Colunas pretas – presença de AO. Os valores indicados abaixo de cada coluna indicam as concentrações de AO utilizadas (0, 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$). As barras representam \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ ($n=4$). (B) Histogramas de um experimento representativo. Na ordenada está representado o número de eventos. Na abscissa está representada em escala logarítmica a intensidade de fluorescência (u.a.). Os histogramas representam a condição de acúmulo de CF. Histograma cinza – ausência de AO. Histogramas pretos – presença de AO. Os valores indicados acima de cada histograma indicam as concentrações de AO utilizadas em $\mu\text{g/ml}$.

Diferentemente do que foi observado para a Ro123, neste caso todas as concentrações de AO (1, 5, 10ug/ml) testadas foram capazes de aumentar o acúmulo de CF, sugerindo que o AO é um inibidor da atividade da MRP1/ABCC1.

4.8 Efeito de AO sobre a extrusão de CF

Para confirmar que os efeitos sobre o aumento do acúmulo estão relacionados à diminuição do efluxo de CF mediado por MRP1/ABCC1, foram realizados experimentos nas quais foram comparadas a extrusão de CF na ausência e na presença do AO (Figura 10).

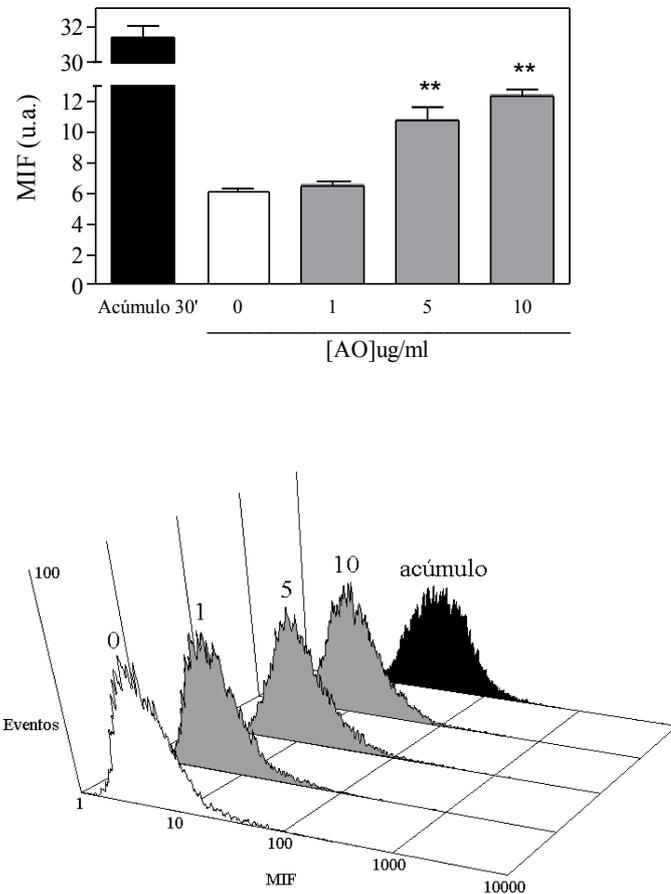


Figura 10. Efeito do AO sobre a extrusão de CF em células Ma104. (A) Gráfico de colunas ($n=3$). Na ordenada está representado a MIF (u.a.) do acúmulo de CF. A coluna preta representa o acúmulo de CF em 30 minutos. A coluna branca representa a extrusão de CF em meio livre de CFDA durante 30 minutos. As colunas cinzas representam a extrusão de CF em meio livre de CFDA durante 30 minutos na presença do AO. Os valores indicados abaixo de cada coluna indicam as concentrações de AO utilizadas durante a extrusão (0, 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$). As barras representam \pm erro padrão da média. (**) $p < 0,01$ ($n=3$). (B) Histogramas de um experimento representativo. Na ordenada está representado o número de eventos. Na abscissa está representada em escala logarítmica a intensidade de fluorescência (u.a.). O histograma preto representa o acúmulo de CF em 30 minutos. O histograma branco representa a extrusão de CF em meio livre de CFDA durante 30 minutos. Os histogramas cinzas representam a extrusão de CF em meio livre de CFDA durante 30 minutos na presença do AO. Os valores indicados acima de cada histograma indicam as concentrações de AO em $\mu\text{g/ml}$ utilizadas durante a extrusão.

Os resultados indicam que as concentrações 5 e 10ug/ml foram capazes de diminuir a extrusão de CF, confirmando que o AO inibe o efluxo de CF mediado por MRP1/ABCC1.

4.9 Reversibilidade da inibição da atividade da MRP1/ABCC1 pelo AO

Sendo o AO um inibidor do efluxo de CF mediado pela MRP1/ABCC1 e diante da possibilidade desta inibição ser irreversível, foram realizados experimentos para investigar se a presença de AO é ou não necessária para a manutenção dos seus efeitos. Ou seja, foram realizados experimentos para se testar a reversibilidade da inibição da atividade da MRP1/ABCC1 pelo AO. Para isto as células Ma104 foram incubadas com CFDA na presença de AO e após este tratamento foi permitido um tempo de 30 minutos para as células expulsarem o CF através da atividade da MRP1/ABCC1 na ausência e na presença de AO.

A Figura 11 mostra que a inibição da MRP1/ABCC1 pelo AO é reversível, pois quando o AO foi retirado do meio as células tiveram uma extrusão maior do que aquelas mantidas em presença do AO.

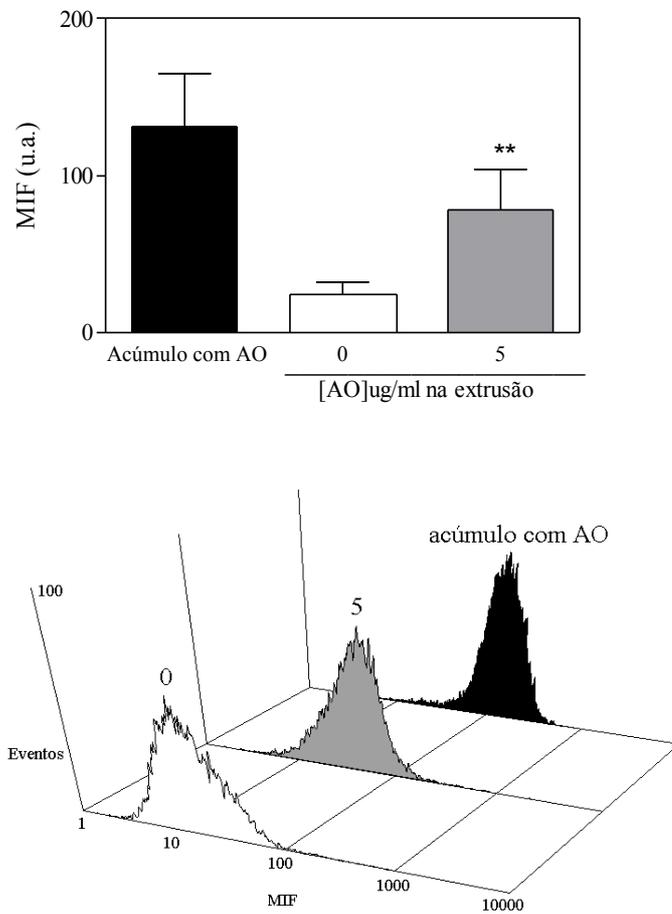


Figura 11. Efeito do AO sobre a extrusão de CF após acúmulo de CF em células Ma104. (A) Gráfico de colunas (n=7) Na ordenada está representado a MIF (u.a.) do acúmulo de CF. A coluna preta representa o acúmulo de CF em 30 minutos na presença de 5ug/ml de AO. A coluna branca representa a extrusão de CF em meio livre de CFDA durante 30 minutos após acúmulo de CF em 30 minutos na presença de 5ug/ml de AO. A coluna cinza representa a extrusão de CF em meio livre de CFDA durante 30 minutos na presença de 5ug/ml de AO após acúmulo de CF em 30 minutos na presença de 5ug/ml de AO. Os valores indicados abaixo de cada coluna indicam as concentrações de AO utilizadas durante a extrusão (0 e 5 ug/ml). As barras representam erro padrão da média.

ordenada está representado o número de eventos. Na abscissa está representada em escala logarítmica a intensidade de fluorescência (u.a.). O histograma preto representa acúmulo de CF em 30 minutos na presença de 5ug/ml de AO. O histograma branco representa a extrusão de CF em meio livre de CFDA durante 30 minutos após acúmulo de CF em 30 minutos na presença de 5ug/ml de AO. O histograma cinza representa a extrusão de CF em meio livre de CFDA durante 30 minutos na presença do AO após acúmulo de CF em 30 minutos na presença de 5ug/ml de AO. Os valores indicados acima de cada histograma indicam as concentrações de AO utilizadas durante a extrusão (0 e 5 ug/ml).

4.10 EFEITO DO MK571 SOBRE A TOXICIDADE DO AO

Para avaliar se o AO é um substrato para o transporte da MRP1/ABCC1 foi realizado um experimento onde se observou o efeito do MK571 sobre a citotoxicidade do AO. Para verificar se o MK571 foi capaz de potencializar o efeito de citotoxicidade do AO. O parâmetro estatístico utilizado foi a interação com intervalo de confiança de 95%. A obtenção da interação foi conseguida após a análise de variância a dois fatores (“Two-way ANOVA”) das duas curvas de toxicidade do AO, a curva na presença e a curva na ausência do MK571. O valor de p obtido foi $<0,05$. Assim, foi considerado que o MK571 potencializou o efeito de toxicidade do AO, como se pode ver na Figura 12, sugerindo ser o AO um substrato para o transporte da MRP1/ABCC1.

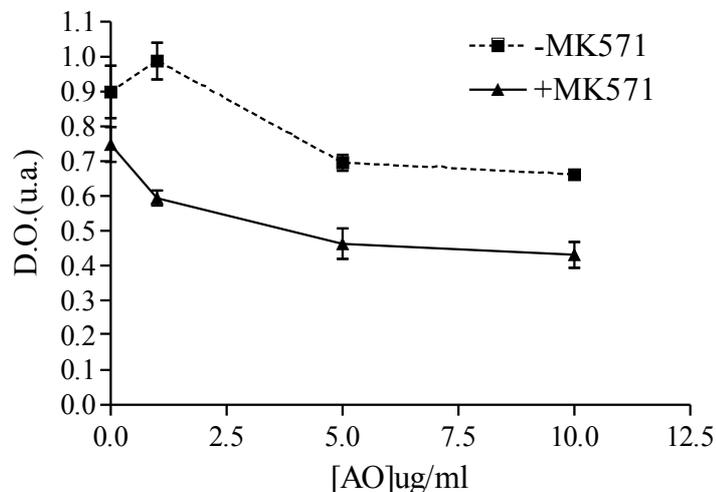


Figura 12. Efeito do MK571 sobre a toxicidade do AO. Na ordenada são mostrados os valores de D.O. (u.a.). Na abscissa são mostrados os valores de concentração de AO. A linha pontilhada representa a curva de toxicidade do AO na ausência de MK571. A linha contínua representa a curva de toxicidade de AO na presença de 12,5uM de MK571. As concentrações de AO utilizadas neste experimento foram 0,1, 5, 10 ug/ml. As barras representam \pm erro padrão da média (n=3).

5. DISCUSSÃO

5.1 AO e Pgp/ABCB1

A Ro123 é considerada um substrato clássico para o transporte realizado pela Pgp/ABCB1, caracterizado em diversos estudos. Em 1988, Neyfakh mostrou que a Ro123 se acumula menos em células resistentes que em células sensíveis a drogas; além disso, foi o primeiro a mostrar que inibidores da atividade da Pgp/ABCB1 aumentavam o acúmulo de Ro123 em células resistentes. Em 1991, Chaudhary *et al.* acharam uma correlação inversa entre a expressão de Pgp/ABCB1 e o acúmulo de Ro123 em células de medula óssea de humanos e, em 1992, Chaudhary *et al.* correlacionaram a expressão de Pgp/ABCB1 em linfócitos de sangue periférico de humanos com o efluxo de Ro123. Bosh *et al.* (1997) detectaram altos níveis de expressão de Pgp/ABCB1 na membrana plasmática de células MDR e relacionaram esta expressão com o transporte de Ro123 e Künel *et al.* (1997) detectaram altos níveis de expressão de Pgp/ABCB1 na linhagem leucêmica MDR K-H300 e observaram que o acúmulo de Ro123 estava diminuído quando comparado com a linhagem parental K-562.

Neste estudo, utilizou-se a medida de acúmulo intracelular da Ro123 para avaliação da capacidade do AO inibir a atividade de transporte da Pgp/ABCB1 em células Ma104. O AO, em três concentrações diferentes (1, 5, 10 ug/ml) não alterou o acúmulo da Ro123. Portanto, estes resultados mostram que o AO não é capaz de inibir a atividade de transporte da Pgp/ABCB1.

O AO é sabidamente um agente citotóxico para células tumorais, inclusive para tumores resistentes a múltiplas drogas por superexpressão de Pgp/ABCB1 (HSU *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2003). A quimioterapia do câncer, de modo geral, combina mais de uma droga citotóxica, formando os chamados “coquetéis”. Portanto, já que o AO não modula a atividade da Pgp/ABCB1, o uso do AO em combinações terapêuticas com outros agentes citotóxicos que são substratos para a Pgp/ABCB1 não

alterará a farmacocinética destas outras drogas. Ou seja, não haverá aumento da biodisponibilidade destas drogas. Alterações na biodisponibilidade levam a uma necessidade de redução das doses dos quimioterápicos utilizados no “coquetel”, o que pode não melhorar o tratamento (LEONARD e FOJO., 2003).

5.2 AO e MRP1/ABCC1

O transporte de CF por MRP1/ABCC1 foi caracterizado em diversos estudos. Em 1999, Curtouis *et al.*(1999) demonstraram que a linhagem de células epiteliais de fígado de rato SDVI, que expressa MRP1/ABCC1 e não expressa MRP2 nem Pgp/ABCB1, transporta CF. Além disso, demonstraram que células MDR GLC4/ADR, que expressam MRP1/ABCC1 tem o acúmulo de CF diminuído em relação a células parentais não resistentes (GLC4) e que não há diferença de acúmulo de CF entre uma linhagem eritroleucêmica resistente por superexpressão de Pgp/ABCB1 (K562R/7) e a parental não resistente (K562). Além disto, Laupèze *et al.* (2001) quantificaram a expressão de RNA mensageiro de MRP1/ABCC1 nos leucócitos de sangue periférico de humanos e observaram a extrusão de CF nestas células e Echevarria-Lima *et al.* (2005) identificaram RNAm de MRP1/ABCC1 mas não de MRP2, MRP3 ou Pgp/ABCB1, em células da linhagem EL4 (timoma murino) que transportam CF.

Nesta dissertação, o CFDA foi utilizado como precursor para a obtenção intracelular de CF e a subsequente medida da atividade de transporte de MRP1/ABCC1. Neste caso, diferentemente do que foi visto para a Pgp/ABCB1, houve um aumento dose dependente (1, 5, 10 ug/ml de AO) no acúmulo de CF nas células Ma104. Este resultado sugere um efeito inibidor do AO sobre a atividade da MRP1/ABCC1.

O aumento intracelular de uma droga não envolve, necessariamente, a diminuição da extrusão. Um aumento da endocitose ou a permeabilização da membrana plasmática também

pode levar a um acúmulo aumentado (KRISHAN *et al.*, 1997b; GOTTESMAN *et al.*, 2002a). Desta forma, foi realizado o ensaio de extrusão de CF nas células Ma104 e foi analisado se o AO seria realmente capaz de diminuir a extrusão. Para uma extrusão de 30 minutos, as concentrações 5 e 10 ug/ml de AO foram capazes de inibir significativamente a saída do CF das células Ma104, confirmando que o AO é um inibidor do transporte da MRP1/ABCC1. Desta forma pode-se afirmar que o aumento do acúmulo de CF observado, pelo menos em parte, é causado pela inibição da atividade da MRP1/ABCC1 pelo AO.

Os inibidores da atividade da MRP1/ABCC1 podem ser reversíveis ou irreversíveis. Dantzig *et al.* (1996), estudando a capacidade reversora da resistência a múltiplas drogas do modulador LY335979, conduziram estudos para examinar o efeito do LY335979 no transporte de daunomicina na linhagem celular de carcinoma de ovário 2780AD. Eles verificaram que o LY335979 aumenta o acúmulo e inibe a extrusão da daunomicina. Além disto, a inibição foi mantida quando a incubação de LY335979 foi realizada apenas durante o período de acúmulo com a daunomicina, com a subsequente realização da extrusão na ausência da sonda e do modulador.

Diante disto, e sendo o AO um inibidor de MRP1/ABCC1, fomos verificar se esta inibição seria reversível ou irreversível. Para isto as células foram pré-tratadas durante 30 minutos com o AO e o CF e, terminado este tempo, foram lavadas e submetidas a mais uma incubação de 30 minutos, na ausência do AO e do CF. Este experimento mostrou que não houve inibição da extrusão do CF na ausência do AO durante a extrusão, caracterizando, assim, a inibição reversível da MRP1/ABCC1 pelo AO.

Sendo o AO uma substância hidrofóbica (URECH *et al.*, 2005), característica de substâncias transportadas pela MRP1/ABCC1, e pelo fato de sua inibição ser reversível, na última investigação experimental desta dissertação foi verificado se o AO seria um substrato

para a MRP1/ABCC1 e o resultado sugeriu fortemente que o AO é um substrato para o transporte da MRP1/ABCC1 (Figura 18).

Todos estes dados, em conjunto, sugerem que o AO é um substrato para MRP1/ABCC1, capaz de inibir de forma dose-dependente e reversível a atividade desta proteína.

É provável que a inibição da atividade da MRP1/ABCC1 pelo AO esteja envolvida em diversos processos biológicos nos quais a ação do AO já foi relatada. Entre eles podem-se citar o efeito anti-inflamatório e anti-HIV.

O LTC₄ é um mediador inflamatório envolvido com a permeabilidade vascular, tônus da musculatura lisa e infiltração de eosinófilos (RAZIN *et al.*, 1982). Os efeitos do LTC₄ estão relacionados ao desenvolvimento e progresso de úlcera gástrica em animais e a inibição da produção de LTC₄ tem efeitos protetores na mucosa gástrica (KOBAYASHI *et al.*, 1995; KONTUREK *et al.*, 1989; KONTUREK *et al.*, 1988). Já foi mostrado que o AO inibe a liberação de LTC₄ por macrófagos ativados (DÍAZ *et al.*, 2000). Portanto, sendo o LTC₄ um dos principais substratos fisiológicos da MRP1/ABCC1 já descritos, a inibição da atividade da MRP1/ABCC1 pelo AO pode contribuir, ao menos em parte, para os efeitos anti-inflamatórios e anti-ulcerativos através da diminuição da liberação de LTC₄.

Além do LTC₄, a GSH e o GSSG, outros dois substratos fisiológicos da MRP1/ABCC1, estão envolvidos no desenvolvimento e progresso do processo inflamatório. A GSH é o principal antioxidante intracelular não enzimático e, na inflamação, níveis elevados de radicais livres parecem ativar o fator nuclear kappa B (NFkB), que possui papel crítico no desenvolvimento e progressão do processo inflamatório; além disto, os níveis de radicais livres parecem regular outros mediadores inflamatórios (RHAMAN e MACNEE, 2000; VILLA *et al.*, 2002; STRASSER *et al.*, 2005). O AO, por inibir a atividade da MRP1/ABCC1, pode aumentar os níveis de GSH intracelular, também, inibindo a ativação

destes mediadores inflamatórios. Corroborando esta hipótese, recentemente foi mostrado que a curcumina inibe a atividade da MRP1/ABCC1, diminui os níveis de radicais livres, aumenta os níveis de GSH e GSSG intracelulares e diminui a ativação de NFkB (CHEARWAE *et al.*, 2005; STRESSER *et al.*, 2005).

A inibição de atividade da MRP1/ABCC1 pelo AO pode ter relação com seus efeitos anti-HIV. Sabe-se que inibidores da atividade da MRP1/ABCC1 são capazes de reduzir a infecção viral. Acredita-se que o mecanismo para este efeito esteja relacionado ao controle do estado redox pela MRP1/ABCC1, pois baixos níveis de radicais livres e maiores níveis de GSH intracelular são considerados inibidores da replicação viral (HERZENBERG *et al.*, 1997; SPECK *et al.*, 2002; LUCIA *et al.*, 2005).

Além de poder contribuir para a explicação destes fenômenos, os dados obtidos nesta dissertação sugerem que o AO não pode ser empregado como quimioterápico no tratamento de tumores que expressam MRP1/ABCC1. Isto porque, em tumores que expressam MRP1/ABCC1, o possível uso do AO como droga citotóxica pode ter uma potência reduzida por ele ser um substrato para esta proteína. No entanto, por se tratar de um inibidor da MRP1/ABCC1 sem efeito sobre a Pgp/ABCC1, o AO poderia ser usado como reversor do fenótipo MDR causado por MRP1/ABCC1 e o seu uso, provavelmente, não teria maiores repercussões na farmacocinética da(s) droga(s) citotóxica(s) co-administrada(s). Contudo, será necessária uma avaliação de possíveis efeitos colaterais relacionados com a expressão de MRP1/ABCC1 em tecidos como, por exemplo, o rim, o testículo, o plexo coróide, a mucosa da orofaringe e as células hematopoiéticas.

6.CONCLUSÕES

A partir dos nossos resultados podemos concluir que:

- O Ácido Oleanólico não foi capaz de aumentar o acúmulo de Ro123 em células Ma104. Desta forma, o Ácido Oleanólico não inibe a atividade de transporte da proteína Pgp/ABCB1.
- O Ácido Oleanólico foi capaz de aumentar o acúmulo de CF de forma dose dependente nas células Ma104. A extrusão de CF pelas células Ma104 foi inibida parcialmente pelo Ácido Oleanólico. Desta forma, o Ácido Oleanólico inibe, de forma dependente da concentração, a atividade de transporte da proteína MRP1/ABCC1.
- O pré-tratamento das células Ma104 com o Ácido Oleanólico não foi capaz de inibir o transporte de CF. Assim, O Ácido Oleanólico inibe a atividade de transporte da proteína MRP1/ABCC1 de forma reversível.
- O MK571, inibidor da atividade da MRP1/ABCC1, foi capaz de potencializar o efeito citotóxico do Ácido Oleanólico em células Ma104, sugerindo que o Ácido Oleanólico é um substrato para o transporte realizado pela MRP1/ABCC1.

7. PERSPECTIVAS

Devido à importância da repercussão dos resultados obtidos nesta dissertação, o estudo da inibição da atividade da MRP1/ABCC1 pelo AO deve continuar, sendo os próximos passos relacionados a seguir:

- Verificar se o AO é capaz de inibir o transporte de outros substratos da MRP1/ABCC1 (ex: LTC₄, GSH)
- Marcar o AO com traçador radioativo que o AO é realmente transportado pela MRP1/ABCC1.
- Verificar se o AO é capaz de alterar a expressão da MRP1/ABCC1 em células tumorais após longos períodos de tratamento.
- Medir os níveis de GSH em células tratadas com AO.
- Verificar se o AO altera a expressão da MRP1/ABCC1 em tecidos normais de animais e em células não tumorais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEGAN, M. R.; FUTSCHER, B. W.; KLIMECKI, W. T.; LIST, A.; DALTON, W. S. **Analysis of multidrug resistance-associated protein (MRP) messenger RNA in normal and malignant hematopoietic cells.** *Cancer Research.* v. 54, p. 4676-4679, 1994.

AMBUDKAR, S. V.; DEY, S.; HRYCYNA, C. A.; RAMACHANDRA, M.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M. **Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter.** *Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.* v. 39, p. 361-398, 1999.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. **Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction.** *Archives of Biochemistry and Biophysics.* v. 303, p. 474-482, 1993.

BIEDLER, J. L.; RIEHM, H. **Cellular resistance to actinomycin D in chinese hamster cells in vitro: Cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies.** *Cancer Research.* v. 30, p. 1174-1184, 1970.

BOSH, I.; CRANKSHAW, C. L.; PWINICA-WORMS, D.; CROOP, J. M. **Characterization of functional assays of multidrug resistance P-glycoprotein transport activity.** *Leukemia.* v. 11, p. 1131-1137, 1997.

BREEUWER, P.; DRODOURT, J. L.; BUNSCHOTEN, N.; ZWIETERING, M. H.; ROMBOUTS, F. M.; ABEE, T. **Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product.** *Applied and environmental microbiology.* v. 61, p. 1614-1619, 1995.

CALLAGHAN, R.; RIORDAN, J. R. **Synthetic and natural opiates interact with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells.** v. 268, p. 16059-16064, 1993.

CAPELLA, M. A. M.; ORIND, M.; MORALES, M. M.; RUMJANEK, V. M.; LOPES, A. G. **Expression of functionally P-glycoprotein in MA104 kidney cells.** *Z. Naturforsch.* v. 54c, p. 119-127, 1999.

CAPELLA, L. S.; GEFÉ, M.; SILVA, E. F.; MORALES, M. M.; AFFONSO-MITIDIERI, O.; LOPES, A. G.; RUMJANEK, V. M.; CAPELLA, M. A. M. **Reduced glutathione protect cells from ouabain toxicity.** *Biochimica et Biophysica Acta.* v. 1526, p. 293-300, 2001.

CASTILHO, Raquel Oliveira. **Química de *Chrysobalanus icaco* L. e *Licania tomentosa* Benth. (Chrysobalanaceae): plantas brasileiras com potencial terapêutico.** 2001. 176 f. Tese (Doutorado em Ciências/Química de Produtos Naturais) - Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

CHAUDHARY, P. M.; RONINSON, I. B. **Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells.** *Cell.* v. 66, p. 85-94, 1991.

CHAUDHARY, P. M.; MECHETNER, E. B.; RONINSON, I. B. **Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes.** *Blood.* v. 80, p. 2735-2739, 1992

CHEARWAE, W.; WU, C. P.; CHU, H. Y.; LEE, T. R.; AMBUDKAR, S. V.; LIMTRAKUL, P. **Curcuminoids purified from tumeric powder modulate the function of human multidrug resistance protein 1 (ABCC1).** *Cancer Chemother. Pharmacol.* v. 57, p. 376-388, 2006.

CHEN, C.; CHIN, J. E.; UEDA, K.; CLARK, D. P.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M.; RONINSON, I. B. **Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-Glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells.** *Cell.* v. 47, p. 381-389, 1986.

CIRRITO, J. R.; DEANE, R.; FAGAN, AM. M.; SPINNER, M. L.; PARSADANIAN, M.; FINN, M. B.; JIANG, H.; PRIOR, J. L.; SAGARE, A.; BALES, K. R.; PAUL, S. M.; ZLOKOVIC, B. V.; PIWNICA-WORMS, D.; HOLTZ, D. M. **P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model.** *J. Clin. Invest.* v. 115, p. 3285-3290, 2005.

COLE, S. P. C.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J. H.; MACKIE, J. E.; GRANT, C. E.; ALMQUIST, K. C.; STEWART, A. J.; KURZ, E. U.; DUCAN, A. M. V.; DEELEY, R. G. **Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line.** *Science.* v. 258, p. 1650-1654, 1992.

COLE, S. P. C.; SPARKS, K. E.; FRASER, K.; LOE, D. W.; GRANT, C. E.; WILSON, G. M.; DEELEY, R. G. **Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells.** *Cancer Research.* v. 54, p. 5902-5910, 1994.

CORDON-CARDO C.; O'BRIEN, J. P.; CASALS, D.; RITTMAN-GRAUER L.; BIEDLER, J. L.; MELAMED, M. R.; BERTINO, J. R. **Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites.** v. 86; p. 695-698, 1989.

CORNWELL, M. M.; SAFA, A. R.; FELSTED, R. L.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. **Membrane vesicles from multidrug-resistant human cancer cells contain a specific 150-**

to 170-kDa protein detected by photoaffinity labeling. Proc. Natl. Acad. Sci.. v. 83, p. 3864-3850, 1986.

COURTOIS, A.; PAYEN, L.; LAGADIC, D.; GUILLOUZO, A.; FARDEL, O. **Evidence for a multidrug resistance - associated protein 1 (MRP1) - related transport system in cultured rat liver biliary epithelial cells.** Life Sciences. v. 64, p. 763-774, 1999.

DANØ, K. **Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells.** Biochimica et Biophysica Acta. v. 323, p. 466-483, 1973.

DANTZIG, A. H.; SHEPARD, R. L.; CAO, J.; LAW, K. C.; EHLHARDT, W. J.; BAUGHMAN, T. M.; BUMOL, T. F.; STARLING, J. J. **Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzenosuberane modulator, LY335979.** Cancer Research. v.56, p. 4171-4179, 1996.

DEBENHAM, P. G.; KARTNER, N.; SIMINOVITCH, L.; RIORDAN, J. R.; LING, V. **DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression.** Molecular and Cellular Biology. v. 2, p. 881-889, 1982.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach.** 3ª edição. England:Willey, 1997. 206p.

DÍAZ, A. M.; ABAD, M. J.; FERNÁNDEZ, L.; RECUERO, C.; VILLAESCUSA, L.; SILVÁN, A. M.; BERMEJO, P. **In vitro anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from Phillyrea latifolia L.** Biol. Pharm. Bull.. v.23, p. 1307-1313, 2000.

ECHEVARRIA-LIMA, J.; KYLE-CEZAR, F.; LEITE, D. F. P.; CAPELLA, L.; CAPELLA, M. A. M.; RUMJANEK, V. M. **Expression and activity of multidrug resistance protein 1 in a murine thymoma cell line.** Immunology. v.114, p. 468-475, 2005.

FERNANDES, J.; CASTILHO, R. O.; DA COSTA, M. R.; WAGNER-SOUZA, K.; KAPLAN, M. A. C.; GATTASS, C. R. **Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines.** Cancer Letters. v. 190, p. 165-169, 2003.

FISHER, G. A.; LUM, B. L.; HAUSSDORF, J.; SIKIC, B. I. **Pharmacological considerations in the modulation of multidrug resistance.** European Journal of Cancer. v. 32A, p. 1088-1088, 1996.

FLENS, M. J.; ZAMAN, G. J. R.; VAN DER VALK, P.; IZQUIERDO, M. A.; SCHROEIJERS, A. B.; SCHEFFER, G. L.; VAN DER GROEP, P.; DE HAAS, M.; MEIJER, C. J. L. M.; SCHEPER, R. J. **Tissue distribution of the multidrug resistance protein**. *Am. J. Pathol.* v. 148, p. 1237-1247, 1996.

FOJO, A.T.; WHANG-PENG, J.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. **Amplification of DNA sequences in human multidrug-resistant KB carcinoma cells**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 82, p. 7661-7665, 1985.

FOJO, A. T.; UEDA, K.; SLAMON, D. J.; POPLACK, D. G.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. **Expression of multidrug-resistance gene in human tumors and tissues**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 84, p. 265-269, 1987.

GEKELER, V.; ISE, W.; SANDERS, K. H.; ULRICH, W. R.; BECK, J. **The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance**. *Biochemical and Biophysical research communications*. v. 208, p. 345-352, 1995.

GINER-LARZA, E. M.; MÁÑEZ, S.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; PRIETO, J. M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J. L. **Oleanonic, a 3-oxotriterpene from Pistacia, inhibits leukotriene synthesis and anti-inflammatory activity**. *European Journal of Pharmacology*. v. 428, p. 137-143, 2001.

GRANT, C. E.; VALDIMARSSON, G.; HIPFNER, D. R.; ALQMIST, K. C.; COLE, S. P. C.; DEELEY, R. G. **Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs**. *Cancer Research*. v. 54, p. 357-361, 1994.

GOLDSTEIN, L. J. **MDR1 gene expression in solid tumours**. *European Journal of Cancer*. v.32A, p. 1039-1050, 1996.

GOTTESMAN, M. M. **Mechanisms of cancer drug resistance**. *Annu. Rev. Med.* v. 53, p. 615-627, 2002a.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S.E. **Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters**. *Nat. Rev. Cancer*. v. 2, p. 48-58, 2002b.

GROS, P.; FALLOWS, D. A.; CROOP, J. M.; HOUSMAN, D. E. **Chromosome-mediated gene transfer of multidrug resistance**. *Molecular and Cellular Biology*. v. 6, p. 3785-3790, 1986.

GUPTA, M. B.; BHALLA, T. N.; GUPTA, G. P.; MITRA, C. R.; BHARGAVA, K. P. **Anti-inflammatory activity of natural products (I) triterpenoids**. European Journal of Pharmacology. v. 6, p. 67-70, 1969.

HAMADA, H.; TSURO, T. **Functional role for the 170- to 180-kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies**. Proc. Natl. Acad. Sci. v. 83, p. 17785-7789, 1986.

HERZENBERG, L. A.; DE ROSA, S. C.; DUBS, J. G.; ROEDERER, M.; ANDERSON, M. T.; ELA, S. W.; DERESINSKI, S. C.; HERZENBERG, L. A. **Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease**. Proc. Natl. Acad. Sci. v. 94, p. 1967-1972, 1997.

HO, G. T.; SORANZO, N.; NIMMO, E. R.; TENESA, A.; GOLDSTEIN, D. B.; SATSANGI, J. **The ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach**. Hum. Mol. Genet.. Epub ahead of print.

HOMOLYA, L.; HOLLÓ, Z.; GERMANN, U. A.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M.; SARDAKI, B. **Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein**. The Journal of Biological Chemistry. v. 268, p. 21493-21496, 1993.

HORIO, M.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. **ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells**. v. 1988, p. 3580-3584, 1988.

HSU, H.Y.; YANG, J.J.; LIN, C.C. **Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibition tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice**. Cancer Letters. v. 111, p. 7-13, 1997.

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**. European Journal of Pharmacology. v. 406, p. 453-460, 2000.

JEDLITSCHKY, G.; LEIER, I.; BUCHHOLZ, U.; CENTER, M.; KEPPLER, D. **ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein**. Cancer Research. v. 54, p. 4833-4836, 1994.

JEDLITSCHKY, G.; LEIER, I.; BUCHHOLZ, U.; BARNOUIN, K.; KURZ, G.; KEPPLER, D. **Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump**. Cancer Research. v. 56, p. 988-994, 1996.

JEONG, H.G. **Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury.** *Toxicology Letters*. v. 105, p. 215-222, 1999.

JONES, K. HOGGARD, P. G.; SALES, S. D.; KHOO, S.; DAVEY, R.; BACK, D. J. **Differences in the intracellular accumulation of HIV protease inhibitors in vitro and the effect of active transport.** *AIDS*. v. 15, p. 675-681, 2001.

JORAJURIA, S.; DEREUDDRE-BOSQUET N.; NAISSANT-STORCK, K.; DORMONT, D.; CLAYETTE, P. **Differential expression levels of MRP1, MRP4, and MRP5 in response to human immunodeficiency virus infection in human macrophages.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 48, p. 1889-1891, 2004.

JULIANO, R. L.; LING, V. **A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants.** *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 455, p. 152-162, 1976.

KALEBIC, T.; KINTER, A.; POLI, G.; ANDERSON, M. E.; MEISTER, A.; FAUCI, A. S. **Suppression of human immunodeficiency virus expression in chronically infected monocytic cells by glutathione, glutathione ester, and N-acetylcysteine.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 88, p. 986-990, 1991.

KASHIWADA, Y.; WANG, H. K.; NAGAO, T.; KITANAKA, S.; YASUDA, I.; FUJIOCA, T.; YAMAGISHI, T.; CONSETINO, L. M.; KOZUKA, M.; OKABE, H.; IKESHIRO, Y.; HU, C. Q.; YEH, E.; LEE, K. H. **Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids.** v. 61, p. 1090-1095, 1998.

KIM, Y. K.; YOON, S. K.; RYU, S. Y. **Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedius*.** *Planta med.* v. 66, p. 485-486, 2000.

KOBAYASHI, K.; ARAKAWA, T. **Arachidonic acid cascade and gastric mucosal injury, protection, and healing: topics of this decade.** *J. Clin. Gastroenterol.* v.21, suppl. 1; p. S12-S17, 1995.

KONTUREK, S. J.; BRZOWSKI, T.; DROZDOWICZ, D.; GARLICKI, J.; BECK, G. **Role of leukotrienes and platelet activating factor in acute gastric mucosal lesions in rats.** *Eur. J. Pharmacol.* v. 164, p. 285-292, 1989.

KONTUREK, S. J.; BRZOWSKI, T.; DROZDOWICZ, D.; J.; BECK, G. **Role of leukotrienes in acute gastric lesions by ethanol, taurocholate, aspirin, platelet-activating factor and stress in rats.** *Dig. Dis. Sci.* v. 33, p. 806-813, 1988.

KRISHAN, A.; FITZ, C. M.; ANDRITSH, I. **Drug retention, efflux, and resistance in tumors.** Cytometry. v. 29, p. 279-285, 1997a.

KRISHAN, A.; SAUERTEIG, A.; ANDRITSCH, I.; WELHAM, L. **Flow cytometric analysis of the multiple drug resistance phenotype.** Leukemia. v. 11, p. 1138-1146, 1997b.

KRISHNA, R.; MAYER, L. D. **Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mecanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs.** European Journal of Pharmaceutical Sciences. v. 11, p. 265-283, 2000.

KRUH, G. D.; ZENG, H.; REA, P. A.; LIU, G.; CHEN, Z. S. LEE, K.; BELINSKY, M. G. **MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents.** Journal of Bioenergetics and Biomembranes. v. 33, p. 493-501, 2001.

KÜHNEL, J. M.; PERROT, J. Y.; FAUSSAT, A. M., MARIE, J. P.; SCHWALLER, M. A. **Functional assay of multidrug resistant cells using JC-1, a carbocyanine fluorescent probe.** Leukemia. v. 11, p. 1147-1155, 1997.

LAM, F. C.; LIU, R.; LU, P.; SHAPIRO, A. B.; RENOIR, J. M.; SHAROM, F. J.; REINER, P. B. **β -amyloid efflux mediated by p-glycoprotein.** J. Neurochem. v. 76, p. 1121-1128, 2001.

LAMPIDIS, T. J.; MUNCK, J. N.; KRISHAN, A.; TAPIERO, H. **Reversal of resistance to rhodamine 123 adriamycin-resistant friend leukemia cells.** Cancer Research. v. 45, p. 2626-2631, 1985.

LAUPÈZE, B.; AMIOT, J.; PAYEN, L.; DRÉNOU, B.; GROSSET, J. M.; LEHNE, G.; FAUCHET, R.; FARDEL, O. **Multidrug resistance protein (MRP) activity in normal mature leucocytes and CD34-positive hematopoietic cells from peripheral blood.** Life Sciences. v. 68, p. 1323-1331, 2001.

LEE, C. G. L.; GOTTESMAN, M. M.; CARDARELLI, C. O.; RAMACHANDRA, M.; JEANG, K. T.; AMBUDKAR, S. V.; PASTAN, I. DEY, S. **HIV-1 Protease inhibitors are substrates for the *MDR1* multidrug transporter.** Biochemistry. v. 37, p. 3594-3601, 1998.

LEGRAND, O; SIMININ, G.; PERROT, J. Y.; ZITTOUN, R.; MARIE, J. P. **Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients.** Blood. v.91, p. 4480-4488, 1998.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; KEPPLER, D. **Characterization of the ATP-dependent leukotriene C4 export carrier in mastocytoma cells.** European Journal of Biochemistry. v.220, p. 599-606, 1994a.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; COLE, S. P. C.; DEELEY, R. G.; KEPPLER, D. **The MRP gene encodes and ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates.** The Journal of Biological Chemistry. v. 269, p. 27807-27810, 1994b.

LEONARD, G. D.; FOJO, T.; BATES, S. E. **The role of ABC transporters in clinical practice.** The Oncologist. v. 8, p. 411-424, 2003.

LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. **Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense.** Toxicology and Applied Pharmacology. v. 2004, p. 216-237, 2005.

LI, J.; GUO, W. J.; YANG, Q. Y. **Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15.** World J. Gastroenterol.. v. 8, p. 493-495, 2002.

LIU, J.; LIU, Y.; MADHU, C.; KLAASSEN, C.D. **Protective effects of oleanolic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice.** The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics. v. 266, p. 1607-1613, 1993.

LIU, J. **Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid.** Journal of Ethnopharmacology. v. 48, p. 57-68, 1995a.

LIU, J.; LIU, Y.; PARKINSON, A.; KLAASSEN, C.D. **Effect of oleanolic acid on hepatic toxicant-activating and detoxifying systems in mice.** The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics. v. 275, p. 768-774, 1995b.

LOE, D. W.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. **Characterization of vincristine transport by the Mr 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione.** Cancer Research. v. 58, p. 5130-5136, 1998.

LORICO, A.; RAPPA, G.; FINCH, R. A.; YANG, D.; FLAVELL, R. A.; SARTORELLI, A. C. **Disruption of the murine MRP(multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione.** *Cancer Research.* v.57, p. 5238-5242, 1997.

LUCIA, M. B.; SAVARINO, A.; STRAFACE, E.; GOLOTTA, C.; RASTRELLI, E.; MATARRESE, P.; RUTELLA, S.; MALORNI, W.; CAUDA, R. **Role of lymphocyte multidrug resistance protein in HIV infection.** *J. Acquir. Immune Defic. Syndr..* v.40, p. 275-266, 2005.

MCGRATH, T.; CENTER, M. S. **Adriamycin resistance in HL60 cells in the absence of detectable P-glycoprotein.** *Biochemical and Biophysical Research Communications.* v. 145, p. 1171-1176, 1987.

MECHETNER, E. B.; RONINSON, I. B. **Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody.** v. 89, p. 5824-5828, 1992.

MIRSKI, S. E. L.; GERLACH, J. H.; COLE, S. P. C. **Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin.** *Cancer Research.* v. 47, p. 2594-2598, 1987.

MIZUNO, N.; NIWA, T.; YOTSUMOTO, Y.; SUGIYAMA, Y. **Impact of drug transporter studies on drug discovery na development.** *Pharmacol. Rev..* v. 55, p. 425-461, 2003.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods.* v. 65, p. 55-63, 1983.

MUELLER, C. F. H.; WIDDER, J. D.; McNALLY, J. S.; McCANN, L.; JONES, D. P.; HARRISON, D. G. **The role of the multidrug resistance protein-1 in modulation of endothelial cell oxidative stress.** *Circulation Research.* v. 97, p. 637-644; 2005.

MÜLLER, M.; MEIJER, C.; ZAMAN, G. J. R.; BORST, P.; SCHEPER, R. J.; MULDER, N. H.; DE VRIES, E. G. E.; JANSEN, P. L. M. **Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport.** *Proc. Natl. Acad. Sci..* v. 91, p. 13033-13037, 1994.

NASCIMENTO, C. R.; BRAGA, F.; CAPELLA, L. S.; SANTOS, A. R.; LOPES, A. G.; CAPELLA, M. A. M. **Comparative study on the effects of cyclosporin A in renal cells in culture.** *Nephron Exp. Nephrol..* v. 99, p.e77-e86, 2005.

NEYFAKH, A. A. **Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance.** *Experimental Cell Research.* v. 174, p. 168-176, 1988.

OVESNÁ, Z.; VACHÁLKOVÁ, A.; HORVÁTHOVÁ, K.; TÓTHOVÁ, D. **Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds.** *Neoplasma.* v. 51, n. 5, p. 327-333, 2004.

PÉTRIZ, J.; GARCÍA-LOPEZ, J. **Flow cytometric analysis of P-glycoprotein function using rhodamine 123.** *Leukemia.* v. 11, p. 1124-1130, 1997.

SAMOVA, L.I.; SHODE, F.O.; RAMNANAN, P.; NADAR, A. **Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europea*, subspecies *africana* leaves.** *Journal of Ethnopharmacology.* v.84, p. 299-305, 2003.

RAHMAN, I.; MACNEE, W. **Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation.** *Eur. Respir. J.* v.16, p. 534-554, 2000.

RAPPA, G.; LORICO, A.; FLAVELL, R.A.; SARTORELLI, A. C. **Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural products toxins.** *Cancer Research.* v. 57, p. 5232-5237, 1997.

RAO, V. V.; DAHLHEIMER, J. L.; BARDGETT, M. E.; SNYDER, A. R.; FINCH, R. A.; SARTORELLI, A. C.; PIWNICA-WORMS, D. **Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.96, p. 3900-3905, 1999.

RAZIN, E.; MENCIA-HUERTA, J. M.; LEWIS, R. A.; COREY, E. J.; AUSTEN, K. F. **Generation of leukotriene C4 from a subclass of mast cells differentiated in vitro from mouse bone marrow.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 79, p. 4665-4667, 1982.

RINGBOM, T.; SEGURA, L.; NOREEN, Y.; PERERA, P.; BOHLIN, L. **Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis.** *J. Nat. Prod.* v. 61, p. 1212-1215, 1998.

RODRÍGUEZ, J. A.; ASTUDILLO, L.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. **Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats.** *Pharmacological research.* v. 48, p. 291-294, 2003.

SAEKI, T.; UEDA, K.; TANIGAWARA, Y.; HORI, R.; KOMANO, T. **Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506**. *The Journal of Biological Chemistry*. v.268, p. 6077-6080, 1993.

SCHINKEL, A. H.; MAYER, U.; WAGENAAR, E.; MOL, C. A. A. M.; VAN DEEMTER, L.; SMITT, J. J.; VAN DER VALK, M. A.; VOORDOUW, A. C.; SPITS, H.; VAN TELLINGEN, O.; ZIJLMANS, J. M. J. M.; FIBBE, W. E.; BORST, P. **Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins**. *Proc. Natl. Acad. sci.* v.94, p. 4028-4033, 1997.

SCHNEIDER, E.; HORTON, J. K.; YANG, C-H.; NAKAGAWA, M.; COWAN, K. H. **Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line selected for etoposide resistance**. *Cancer Research*. v. 54, p. 152-158, 1994.

SHEN, H.; PAUL, S.; BREUNINGER, L. M.; CIACCIO, P. J.; LAING, N. M.; HELT, M.; TEW, K. D.; KRUH, G. D. **Cellular and in vitro transport of glutathione conjugates by MRP**. *Biochemistry*. v. 35, p. 5719-5725, 1996.

SPECK, R. R.; YU, X. F.; HILDRETH, J.; FLEXNER, C. **Differential effects of P-glycoprotein and multidrug resistance protein-1 on productive human immunodeficiency virus infection**. *The Journal of Infectious Diseases*. v. 186, p. 332-340, 2002.

SRINIVAS, R. V.; MIDDLEMAS, D.; FLYNN, P.; FRIDLAND, A. **Human Immunodeficiency virus protease inhibitors serve as substrates for multidrug transporter proteins MDR1 and MRP1 but retain antiviral efficacy in cell lines expressing these transporters**. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. v.42, p. 3157-3162, 1998.

STRASSER, E. M.; WESSNER, B.; MANHART, N.; ROTH, E. **The relationship between the anti-inflammatory effects of curcumin and cellular glutathione content in myelomonocytic cells**. *Biochemical Pharmacology*. v. 70, p. 552-559, 2005.

THIEBAUT, F.; TSURO, T.; HAMADA, H.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I.; WILLINGHAM, M. C. **Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 84, p. 7735-7738, 1987.

THIEBAUT, F.; TSURO, T.; HAMADA, H.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I.; WILLINGHAM, M. C. **Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein p170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein**. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. v.37, p. 159-164, 1989.

UEDA, K.; CLARK, D. P.; CHEN, C.; RONINSON, I. B.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. **The human multidrug resistance (mdr1) gene - cDNA cloning and transcription initiation.** The Journal of Biological Chemistry. v. 262, p. 506-508, 1987a.

UEDA, K.; CARDARELLI, C.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. **Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastin.** Proc. Natl. Acad. Sci.. v. 84, p. 3004-3008, 1987b.

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.** The Journal of Biological Chemistry. v. 267, p. 24248-24252, 1992.

URECH, K.; SCHER, J. M.; HOSTANSKA, K.; BECKER, H. **Apoptosis inducing activity of viscin, a lipophilic extract from *Viscum album* L.** Journal of Pharmacy and Pharmacology. v. 57, p. 101-109, 2005.

VAN DER KOLK, D. M.; DE VRIES, E. G. E., KONING, J. A.; VAN DER BERG, E.; MÜLLER, M.; VELLENGA, E. **Activity and expression of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 in acute Myeloid leukemia cells, tumor cell lines, and normal hematopoietic CD34+ peripheral blood cells.** Clinical Cancer Research. v. 4, p.1727-1736, 1998.

VAN DER SANDT, I. C. J.; VOS, C. M. P.; NABULSI, L.; BLOM-ROOSEMALEN, M. C. M.; VOORWINDEN, H. H. **Assessment of active transport of HIV protease inhibitors in various cell lines and in vitro blood-brain barrier.** AIDS. v. 15, p. 483-491, 2001.

VERSANTVOORT, C. H. M.; BROXTERMAN, H. J.; PINEDO, H. M.; DE VRIES, E. G. E.; FELLER, N.; KUIPER, C. M.; LANKELMA, J. **Energy-dependent processes involved in reduced drug accumulation in multidrug-resistant human lung cancer cell lines without P-glycoprotein expression.** Cancer research. v. 52, p. 17-23, 1992.

VILLA, P.; SACCANI, A.; SICA, A.; GHEZZI, P. **Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense.** The journal of Infectious Diseases. v. 185, p. 1115-1120, 2002.

WIJNHOLDS, J.; EVERS, R.; VAN LEUDSEN, M. R.; MOL, C. A. A. M.; ZAMAN, G. J. R.; MAYER, U.; BEIJNEN, J. H.; VAN DER VALK, M.; KRIMPENFORT, P.; BORST, P. **Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein.** Nature Medicine. v. 3, p. 1275-1279, 1997.

WIJNHOLDS, J.; SCHEFFER, G. L.; VAN DER VALK, M.; VAN DER VALK, P.; BEIJNEN, J. H.; SCHEPER, R. J.; BORST, P. **Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage.** J. Exp. Med. v. 188, p. 797-808, 1998.

WIJNHOLDS, J.; DE LANGE, E. C. M.; SCHEFFER, G. L.; VAN DEN BERG, D. J.; MOL, C. A. A. M.; VAN DER VALK, M.; SCHINKEL, A. H.; SCHEPER, R. J.; BREIMER, D. D.; BORST, P. **Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier.** The Journal of Clinical Investigation. v. 105, p. 279-285, 2000.

YOUNG, L. C.; CAMPLING, B. G.; VOSKOGLOU-NOMIKOS, T.; COLE, S. P. C.; DEELEY, R. G.; GERLACH, J. H. **Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response.** Clinical Cancer Research. v.5, p. 673-680, 1999.

YOUNG, L. C.; CAMPLING, B. G.; COLE, S. P. C.; DEELEY, R. G.; GERLACH, J. H. **Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger.** Clinical Cancer Research. v.7, p. 1798-1804, 2001.

ZAMAN, G. J. R.; VERSANTVOORT, C. H. M.; SMIT, J. J. M.; EIJDENS, E. W. H. M.; DE HAAS, M.; SMITH, A. J.; BROXTERMAN, H. J.; MULDER, N. H.; DE VRIES, E. G. E.; BAAS, F.; BORST, P. **Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines.** Cancer Research. v. 53, p. 1747-1750, 1993.

ZAMAN, G. J. R.; FLENS, M. J.; VAN LEUSDEN, M. R.; DE HAAS, M.; MÜLDER, H. S.; LANKELMA, J.; PINEDO, H. M.; SCHEPER, R. J.; BAAS, F.; BROXTERMAN, H. J.; BORST, P. **The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump.** Proc. Natl. Acad. Sci. v. 91, p. 8822-8826, 1994.

ZAMAN, G. J. R.; LANKELMA, J.; VAN TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J.; DEKKER, H.; PAULUSMA, C.; ELFERINK, R. P. J. O.; BAAS, F.; BORST, P. **Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein.** Proc. Natl. Acad. Sci. v. 92, p. 7690-7694, 1995.

ZHU, Y. M.; SHEN, J. K.; WANG, H. K.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. H. **Synthesis and anti-HIV activity of oleanolic acid derivatives.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. v. 11, p. 3115-3118, 2001.

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](#)