



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

---

Dissertação de Mestrado

**ASSOCIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A GLICOCORTICÓIDES COM  
RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS NA  
ARTRITE REUMATÓIDE**

**LUCIANA DA COSTA BOROWSKI**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular  
como requisito parcial para a ob-  
tenção do grau de Mestre

Orientador : Prof. Dr. Moisés E. Bauer

PORTO ALEGRE (RS)

ABRIL de 2006

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Ao professor Moisés Evandro Bauer pela orientação, apoio intelectual e compreensão.

Ao Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas pelo auxílio na busca de pacientes.

Ao pessoal do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, especialmente, Rodrigo Pestana Lopes, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos.

As minhas amigas Daniela Borges da Silveira e Daniele Gehlen Klaus pelos momentos de descontração, consolo e apoio.

As minhas companheiras de apartamento Greice Mattei e Liana Bertolim Rossato pela companhia, compreensão e apoio nos momentos difíceis.

Ao meu namorado Thiago Ghilardi pela compreensão, apoio e auxílio na área da informática.

Aos meus irmãos e cunhadas pelo carinho e compreensão.

Aos meus pais pelo apoio e por acreditarem em mim.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

# ÍNDICE

|  |            |
|--|------------|
| <b>AGRADECIMENTOS .....</b>  | <b>II</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>  | <b>V</b>   |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>  | <b>VI</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>   | <b>VII</b> |
| <b>RESUMO .....</b>  | <b>IX</b>  |
| <b>1. APRESENTAÇÃO DO TEMA.....</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1. ARTRITE REUMATÓIDE .....  | 1          |
| 1.2. IMUNOSSENECÊNCIA – FOCO SOBRE AS CÉLULAS T .....                        | 4          |
| 1.3. GLICOCORTICÓIDES .....  | 6          |
| 1.4. SENSIBILIDADE AOS GLICOCORTICÓIDES .....                                | 9          |
| 1.5. GLICOPROTEÍNA-P E POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO GENE ABCB1 .....           | 11         |
| <b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                   | <b>15</b>  |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>   | <b>21</b>  |
| 3.1. GERAL.....  | 21         |
| 3.2. ESPECÍFICOS.....  | 21         |
| <b>4. ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>  | <b>22</b>  |
| <b>SUMMARY .....</b>   | <b>23</b>  |
| <b>5. INTRODUCTION.....</b>  | <b>24</b>  |
| <b>6. MATERIALS AND METHODS.....</b>   | <b>25</b>  |
| 6.1. SUBJECTS .....  | 25         |
| 6.2. COLLECTION OF PERIPHERAL BLOOD AND ISOLATION OF MONONUCLEAR CELLS ..... | 26         |
| 6.3. CELL CULTURES AND STEROID SENSITIVITY ASSAYS .....                      | 26         |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 6.4.       | CELL PROLIFERATION/VIABILITY ASSAY .....                          | 27        |
| 6.5.       | STEROID RESPONSIVENESS .....                                      | 27        |
| 6.6.       | RHODAMINE 123-EFFLUX ASSAY .....                                  | 28        |
| 6.7.       | ABCB1 GENOTYPING.....   | 28        |
| 6.8.       | STATISTICAL ANALYSIS.....   | 28        |
| <b>7.</b>  | <b>RESULTS .....</b>  | <b>29</b> |
| 7.1.       | DEMOGRAPHIC DATA AND CLINICAL CHARACTERISTICS .....               | 29        |
| 7.2.       | LYMPHOCYTE PROLIFERATION AND SENSITIVITY TO GLUCOCORTICOIDS ..... | 30        |
| 7.3.       | FUNCTIONAL ACTIVITY OF P-GLYCOPROTEIN.....                        | 35        |
| 7.4.       | GENETIC POLYMORPHISMS OF THE ABCB1 DRUG TRANSPORTER .....         | 38        |
| 7.5.       | CLINICAL CORRELATES OF P-GP ACTIVITY .....                        | 39        |
| <b>8.</b>  | <b>DISCUSSION .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>9.</b>  | <b>ACKNOWLEDGMENTS .....</b>                                      | <b>43</b> |
| <b>10.</b> | <b>REFERENCES .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>11.</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                                 | <b>47</b> |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Table 1.</b> Demographic and clinical characteristics of the RA patients | 30 |
| <b>Table 2.</b> Frequency of DEX and CORT responsiveness of RA patients     | 35 |
| <b>Table 3.</b> Frequencies of the ABCB-1 polymorphisms                     | 39 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Fig. 1.</b> Non-stimulated proliferation/viability                          | 31 |
| <b>Fig. 2.</b> Mitogen-induced T-cell proliferation                            | 32 |
| <b>Fig. 3.</b> Non-stimulated PBMC sensitivity to DEX in patients and controls | 33 |
| <b>Fig. 4.</b> Peripheral T-cell sensitivities to DEX and CORT                 | 34 |
| <b>Fig. 5.</b> Representative flow cytometric analysis of P-gp function        | 37 |
| <b>Fig. 6.</b> Analysis of P-gp activity                                       | 38 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

- GCs – glicocorticóides
- AR – artrite reumatóide
- TNF $\alpha$  - fator de necrose tumoral
- HLA – antígeno leucocitário humano
- IL – interleucina
- PCR – proteína C reativa
- FR – fator reumatóide
- CCP – autoanticorpos para peptídeo cíclico
- DMARDs – drogas antireumáticas modificantes da doença
- MTX – metotrexate
- VHS – taxa de sedimentação eritrocitária
- cGCR – receptor de GC da superfície celular ou citoplasma
- HSPs – proteína de choque térmico
- GREs – elementos responsivos aos GCs
- mGCR – receptor de GC ligado à membrana celular
- GCR $\alpha$  e  $\beta$  - isoformas de receptores de GCs
- CR – resistente aos corticosteróides
- CS – sensível aos corticosteróides
- I $\kappa$ B $\alpha$  - inibidor de proteínas I $\kappa$ B
- NF $\kappa$ B - fator nuclear- $\kappa$ B
- PBMCs – células mononucleares de sangue periférico
- PHA – fitohemaglutinina
- CORT – corticosterona

ABC – família de proteínas dependente de ATP

MDR – resistência a múltiplas drogas

P-gp – glicoproteína-P

*ABCB* - gene de resistência a múltiplas drogas

HPA – eixo hipotálamo-hipófise-adrenal



## RESUMO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença auto-imune associada com inflamação sinovial crônica caracterizada por infiltração de linfócitos que danifica ossos e cartilagens e eventualmente conduzindo para a destruição das articulações. Ambos o envelhecimento e o tratamento crônico com glicocorticóides (GCs) freqüentemente conduzem à resistência esteroi-dal. Aqui, nós investigamos se a resistência aos GCs está associada com resistência a múltiplas drogas (MDR). Setenta e quatro pacientes com AR e 26 controles saudáveis fizeram parte deste estudo. Células mononucleares de sangue periférico foram isoladas e a sensibi-lidade das células T aos GCs foi avaliada *in vitro*. A atividade funcional da P-gp, uma mo-lécula bombeadora que diminui as concentrações intracelulares de drogas por aumento do efluxo das drogas, foi avaliada em linfócitos periféricos bem como os polimorfismos do gene *ABCB1/MDR1*. Os pacientes mostraram aumento da proliferação de células T estimu-ladas e basais comparados com os controles. O envelhecimento significativamente reduziu a proliferação de células T somente no grupo controle. Pacientes e controles apresentaram sensibilidades semelhantes aos GCs. As células não estimuladas dos pacientes com meia-idade foram mais sensíveis a dexametasona que as dos sujeitos jovens ou idosos. Pacientes apresentaram uma maior porcentagem de linfócitos extruindo rodamina 123 (Rh123<sup>dim</sup>) que os controles apesar da semelhante atividade da P-gp. A distribuição dos genótipos *ABCB1* nos pacientes não diferiu significativamente dos controles. Estes dados sugerem que as células mononucleares de pacientes com AR sob tratamento com múltiplas drogas são ple-namente responsivas aos GCs *in vitro* e apresentam maior extrusão de drogas apesar da função normal da P-gp.

## 1. APRESENTAÇÃO DO TEMA

As alterações do sistema imune durante o envelhecimento (imunossenescência) são as principais causas que contribuem para a morbidade e mortalidade, principalmente devido ao aumento na incidência de infecções, doenças auto-imunes e câncer (Bauer *et al.* 2003). Embora, uma disfunção generalizada nos linfócitos T seja considerada como principal fator para a imunossenescência, poucos estudos investigaram as interações medicamentosas nos idosos e seus efeitos sobre a regulação das células T. Além disso, poucas intervenções terapêuticas foram realizadas com o intuito de amenizar ou reverter o impacto da imunossenescência sobre a saúde do idoso.

Estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa sugerem uma importante desregulação neuroimunoendócrina no envelhecimento saudável. Em particular, foi demonstrado que as células T dos idosos saudáveis tornam-se mais resistentes ao tratamento *in vitro* com glicocorticóides (GCs). Esta resistência foi relacionada ao aumento da produção endógena de cortisol ao longo do envelhecimento (Collaziol *et al.* 2004). Entretanto, sabe-se muito pouco sobre o impacto do envelhecimento patológico sobre a regulação neuroimunológica. Por exemplo, é importante determinar a distribuição da população de pacientes resistentes aos GCs para diversas doenças crônico-inflamatórias, incluindo a artrite reumatóide. Esta informação pode ser útil para uma terapia individual para o paciente (Hirano *et al.* 2000).

### 1.1. Artrite reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença auto-imune, com sinal de inflamação sinovial, caracterizada por uma resposta imune celular crônica, isto é, uma infiltração de

linfócitos T no líquido sinovial (Doran *et al.* 2002), causando danos aos ossos e cartilagens e eventualmente conduzindo à destruição das articulações (Feldmann *et al.* 1996). Embora a etiologia da AR ainda não seja conhecida, é amplamente aceito que o recrutamento dos linfócitos para áreas da inflamação e a subsequente destruição da cartilagem e dos ossos exercem um papel chave na patogênese da doença (Manolios *et al.* 1991; Postigo *et al.* 1992).

Diferentes tipos celulares e seus mediadores estão envolvidos na destruição dos tecidos pela inflamação. Por exemplo, sabe-se que as células T, B, monócitos/macrófagos bem como as citocinas pró-inflamatórias (e.g. fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) e interleucina (IL)-1 $\beta$ ) constituem mecanismos imunopatológicos importantes na AR (Thomas *et al.* 1999; Kim & Weisman 2000; Weyand 2000).

Alguns estudos têm demonstrado a existência de células T regulatórias (Treg: CD4+CD25+Foxp3+) em humanos, estas células constituem 5-15% das células T CD4+ periféricas (Dieckmann *et al.* 2001; Jonuleit *et al.* 2001; Levings *et al.* 2001; Stephens *et al.* 2001; Taams *et al.* 2001; Taams *et al.* 2002). As células Treg suprimem as respostas das células T de uma maneira contato-dependente celular, isto indica que estas células podem contribuir para a regulação da resposta imune (van Amelsfort *et al.* 2004). Em pacientes com AR, pode ser encontrado um aumento na porcentagem e na função supressiva da população de células T CD4+CD25+, particularmente nas articulações, sugerindo que um mecanismo imunoregulatório aumentado está presente na AR devido à existência de um sistema de feedback negativo no qual as células T regulatórias CD4+CD25+ são geradas devido a constante inflamação (van Amelsfort *et al.* 2004). O fato de que o processo inflamatório na AR é crônico sugere que a regulação imune nas articulações esteja prejudicada. Esta regulação prejudicada pode ser causada por uma resposta inflamatória excessiva junto

com uma deficiência nos mecanismos de controle da resposta imune (van Amelsfort *et al.* 2004).

A AR é cerca de duas vezes mais prevalente nas mulheres do que nos homens. Isso pode ser explicado pela complexa interação de hormônios sexuais femininos com as células do sistema imune. Existe também uma contribuição genética clara para esta doença localizada no locus II da classe HLA (antígeno leucocitário humano), apresentando como haplótipos suscetíveis à doença DR1 e DR4. Recentemente, outros genes candidatos têm sido investigados, incluindo os polimorfismos de citocinas (Feldmann *et al.* 1996).

A inflamação aguda pode ser iniciada por um número de eventos inflamatórios que são programados em uma seqüência orquestrada de processos fisiológicos os quais iniciam com a liberação das citocinas proinflamatórias como  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e  $IL-6$ . Estes mediadores inflamatórios ativam uma cascata de respostas locais e sistêmicas. Se a inflamação aguda não for contida, segue a fase crônica a qual é a característica central de muitas doenças auto-imunes. Estas desordens são caracterizadas ao nível molecular pela expressão crônica elevada de múltiplos genes de citocinas proinflamatórias (Chikanza *et al.* 2003).

Nas doenças crônicas inflamatórias, como a AR, a desregulação dos reflexos nervosos autônomos, a elevação do sinal nervoso simpático sistêmico, o aumento dos neurotransmissores simpáticos no plasma e a perda de fibras nervosas simpáticas locais são conseqüências da resposta proinflamatória exagerada (Straub *et al.* 2003). A desregulação da resposta inflamatória, com um balanço alterado entre a degradação e a síntese de proteínas, mudanças no humor e comportamento, exercem um papel crítico no declínio da performance física e massa muscular nos pacientes com AR (Straub *et al.* 2003). A circulação de citocinas proinflamatórias e as células imunes ativadas conduzem para uma deterioração

funcional do sistema nervoso central, sistema nervoso autônomo, hipotálamo, glândula hipófise, glândulas endócrinas periféricas, trato gastrointestinal, fígado, ossos, músculos, pele, rins, e outros órgãos e sistemas. Estas mudanças podem acontecer em poucos meses, dependendo do grau da carga pró-inflamatória. O paciente com risco de apresentar estas mudanças deve ser sujeito a procedimentos diagnósticos adequados, pois diagnósticos de envelhecimento precoce podem conduzir a uma terapia apropriada (Straub *et al.* 2003).

Existem alguns marcadores prognósticos da doença destrutiva em pacientes com artrite ativa, incluindo: alto número de articulações inchadas, proteína C reativa (PCR) elevada, presença do fator reumatóide (FR) e/ou autoanticorpos para peptídeo cíclico (CCP) (Smolen *et al.* 2005).

O tratamento para AR inclui drogas anti-inflamatórias, imunossupressores, anti-maláricos e inibidores de citocinas. A terapia primariamente utilizada baseia-se no uso de drogas antireumáticas modificantes da doença (DMARDs). A DMARD mais efetiva é o metotrexate (MTX). Entretanto, terapias combinadas, incluindo altas doses de GCs e combinações de MTX, são mais efetivas que as monoterapias (Smolen *et al.* 2005).

### *1.2. Imunossenescência – foco sobre as células T*

O envelhecimento está associado com alterações em diversos sistemas, incluindo o sistema imune. Estas alterações incluem disfunções na resposta imune inata, processamento de antígenos, resposta humoral, ativação celular e proliferação de células T. Contudo, a grande maioria dos estudos demonstrou que a redução da resposta imune celular no envelhecimento está fortemente associada com disfunções das células T. Uma importante alteração observada nos idosos é a redução da capacidade de expansão clonal das células T. A consequência final da ativação de células T durante uma resposta imune é a expansão clo-

nal, com formação de células efetoras e de memória. Uma das maneiras mais simples de se avaliar a capacidade de expansão clonal é através do ensaio de proliferação linfocitária. Mudanças na capacidade de proliferação refletem uma perda importante da resposta imune adaptativa, acarretando numa maior susceptibilidade às infecções e câncer (Malaguarnera *et al.* 2001; Pawelec *et al.* 2002).

Nas doenças inflamatórias crônicas sugere-se que a carga inicial proinflamatória tem um impacto geral no envelhecimento prematuro, afetando sistemas orgânicos como os sistemas endócrino e neuromuscular. Foi recentemente discutido que a reação inflamatória aguda pode acelerar o processo de envelhecimento e que uma carga proinflamatória crônica, como na AR, pode acelerar a endocrinossenescência, neurossenescência e senescência dos sistemas musculares (Straub *et al.* 2003).

Em pacientes com AR, as especificidades dos receptores de células T chegam somente a 10% do repertório esperado em um indivíduo jovem saudável (Weyand & Goronzy 2002). Interessantemente, uma concentração muito semelhante do repertório de células T é tipicamente encontrada em pessoas idosas, mais provavelmente devido aos contínuos encontros com antígenos estranhos ou possíveis autoantígenos. Em ambas as situações, a carga oligoantigênica provavelmente leva à centralização do repertório, a qual é acompanhada pela redução do espaço imunológico em órgãos linfóides periféricos (Straub *et al.* 2003).

As células linfóides de pacientes com AR e de idosos têm um fenótipo senescente com uma diminuição no comprimento dos telômeros paralela à perda de células T naïve e produção tímica (Koetz *et al.* 2000). Essas alterações do sistema imune, as quais são em muitos aspectos semelhantes às da imunossenescência de idosos saudáveis, são provavel-

mente úteis para controlar os contínuos ataques agressivos contra um possível antígeno. Em idosos saudáveis, bem como em pacientes com AR, estas mudanças adaptativas são paralelas pela ativação contínua de monócitos/macrófagos e pela inflamação sistêmica a qual é evidente pelo aumento no soro dos níveis de TNF $\alpha$ , IL-6 e muitas outras substâncias (Straub *et al.* 2003).

### *1.3. Glicocorticóides*

Os GCs são potentes drogas imunossupressoras e antiinflamatórias e têm sido usados com sucesso no tratamento da AR, asma, lúpus eritematoso sistêmico, leucemias, linfomas, alergias e na rejeição de órgãos transplantados. Eles representam os medicamentos mais importantes utilizados entre as drogas antiinflamatórias e seu uso terapêutico vem aumentando continuamente nos últimos anos (Schacke *et al.* 2002; Wan & Nordeen 2002). Entretanto, foi observada uma ampla variação na sensibilidade dos linfócitos aos GCs entre indivíduos saudáveis (Hearing *et al.* 1999) e, dessa forma, esta droga não representa sempre uma solução satisfatória (Hirano *et al.* 2000).

Os GCs são reguladores essenciais do desenvolvimento, homeostasia e funções efetoras do sistema imune inato e adaptativo (Sternberg 2001; Cancedda *et al.* 2002; Pitzalis *et al.* 2002; Webster *et al.* 2002). Eles alteram a ativação, diferenciação e maturação de muitos tipos de células imunes, bem como exercem múltiplos papéis na regulação da sensibilidade imune celular a apoptose (Ashwell *et al.* 2000; Refojo *et al.* 2001). Os GCs são hormônios naturais antiinflamatórios produzidos pelas glândulas adrenais segundo o controle do hipotálamo. Na espécie humana, o cortisol representa o principal GC secretado pela adrenal. Eles podem reduzir efetivamente os parâmetros de inflamação como a taxa de sedimentação eritrocitária (VHS) e a PCR, induzindo a remissão da doença (Chikanza *et al.*

2003). Os mecanismos de ação dos GCs podem ser subdivididos em efeitos genômicos e não-genômicos (Gold *et al.* 2001).

A maioria dos efeitos antiinflamatórios e imunomodulatórios dos GCs é mediada predominantemente por mecanismos genômicos (Buttgereit *et al.* 2004). Isso acontece após a ligação do hormônio com seu respectivo receptor na superfície celular ou no citoplasma (cGCR). O complexo hormônio:cGCR geralmente induz transativação ou inibem a síntese de proteínas regulatórias (Almawi & Tamim 2001). Os cGCRs constituem um complexo de multiproteínas consistindo de várias proteínas de choque térmico (HSPs), incluindo as HSP90, HSP70, HSP56 e HSP40. Após a ligação dos GCs com cGCRs, ocorre a dissociação das HSPs. A translocação para o núcleo celular é então possível e o complexo GC/GCR finalmente liga-se em sítios de DNA específicos, nos elementos responsivos aos GCs (GREs) (Almawi & Tamim 2001). Dependendo do gene alvo, a transcrição é então ativada (transativação via GRE positivo) ou inibida (GRE negativo) (Buttgereit *et al.* 2004). A magnitude dos efeitos biológicos é determinada, entre outros fatores, pela densidade de receptores das células-alvo e a afinidade dos receptores aos GCs (Schlaghecke *et al.* 1994).

Os mecanismos de ação dos GCs não-genômicos são responsáveis pelos efeitos rápidos, que ocorrem em poucos segundos ou minutos. Este efeito é refletido por ser mediado pela ocupação do cGCR, mas não pelas mudanças na transcrição do gene (Croxtall *et al.* 2000). Estes mecanismos são mediados através de receptores de GCs ligados à membrana (mGCR). Estas descobertas são consistentes com as observações clínicas que em pacientes com AR: a frequência de monócitos positivos ao mGCR está elevada e está correlacionada positivamente com a atividade da doença (Buttgereit *et al.* 2004). Esta observação pode implicar que os mGCR exercem um papel na patogênese da doença; entretanto,



é mais provável que eles estejam envolvidos na regulação por feedback negativo (Buttgereit *et al.* 2004).

Existem duas isoformas de receptores de GCs: GCR $\alpha$  e GCR $\beta$ . Somente o GCR $\alpha$  é capaz de ligar-se aos GCs. O GCR $\beta$  pode agir como um inibidor negativo do GCR $\alpha$  (Encio & Detera-Wadleigh 1991; de Castro *et al.* 1996). Alguns estudos mostraram que o GCR $\beta$  está super expresso em pacientes com AR que apresentam resistência linfocitária aos GCs (Chikanza & Grossman 2000).

Os efeitos dos GCs são devido principalmente à inibição da liberação das citocinas por células imunes. Os GCs, após sua ligação com os receptores intracelulares, induzem a transcrição do inibidor de proteínas I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) que segura o fator nuclear- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) no citoplasma, em sua forma inativa, impedindo o NF $\kappa$ B de migrar para o núcleo, se ligar ao elemento de resposta apropriado no DNA e ativar as citocinas, contribuindo, dessa forma, para a imunossupressão mediada por esteróides (Auphan *et al.* 1995; Scheinman *et al.* 1995). Eles também suprimem a adesão celular, a marginação e migração, ativação dos macrófagos, apresentação de antígenos, expressão de receptores de células T, ativação dos linfócitos T, proliferação, diferenciação e função das células maduras, incluindo citotoxicidade e função das células B como a produção de anticorpos (Sternberg 2001). Os GCs também induzem a apoptose de linfócitos e timócitos, mas estes efeitos podem ser secundários pela inibição da produção de citocinas e fatores de proliferação (Sternberg 2001). Além da imunossupressão celular, os GCs também apresentam ações imunoestimulatórias (Wilckens & De Rijk 1997; Dhabhar & McEwen 1999; Franchimont *et al.* 1999), eles parecem aumentar a resposta imune inata embora reprimindo parte da resposta imune adaptativa em estado de repouso. Isto sugere que os GCs ajudam antígenos por estimulação do

tráfego celular enquanto param as respostas imunes celulares por inibição da apresentação de antígenos e ativação das células T (Galon *et al.* 2002).

#### *1.4. Sensibilidade aos glicocorticóides*

Embora muitos pacientes respondam a terapia com GCs, uma pequena subpopulação de indivíduos fracassa para responder aos efeitos terapêuticos desta classe de medicamentos e pode ser classificada como resistente aos corticosteróides (CR) ou sensível (CS) (Corkill *et al.* 1990; Chikanza & Panayi 1993). Há evidências que indivíduos com asma ou AR podem ser divididos em subgrupos CR ou CS em estudos *in vitro* usando a capacidade dos GCs em inibir a proliferação celular induzida por fitohemaglutinina (PHA) ou conca-  
navalina-A (Langhoff *et al.* 1986; Corkill *et al.* 1990; Kirkham *et al.* 1991).

A resposta clínica de pacientes com AR tratados com GCs é afetada pela resistência celular esteroideal. Isto pode ser notado em muitos pacientes que requerem grandes quantidades e/ou períodos de administração prolongados de GCs (Hirano *et al.* 2000). A resistência aos GCs pode ser uma propriedade intrínseca de cada indivíduo (Chikanza & Panayi 1993), provavelmente tendo uma base genética (Vingerhoeds *et al.* 1976).

Os mecanismos de resistência aos GCs relacionam-se em parte por alterações nas citocinas e hormônios (Chikanza & Kozaci 2004). Ao nível molecular, podemos ressaltar as anormalidades nas vias de sinalização intracelular, defeitos no complexo proteína/receptor dos GCs e alterações na função do GCR $\alpha$  bem como no balanço e na expressão celular de CR $\beta$  (Chikanza & Kozaci 2004).

Existem dados conflitantes em relação à sensibilidade linfocitária aos esteróides na AR. Um estudo indicou um aumento da sensibilidade linfocitária periférica aos esterói-

des (Heijnen & Kavelaars 1999), enquanto outro sugere que a exposição crônica a inflamação na AR diminui a sensibilidade aos GCs dos linfócitos periféricos (Onda *et al.* 2004). Essas discrepâncias podem ser devido a alguns fatores modificantes da doença incluindo idade e severidade da doença (del Rincon *et al.* 2004).

Para avaliar o potencial terapêutico individual para os GCs, é importante conhecer a farmacodinâmica e farmacocinética dos GCs no organismo. É necessário determinar a distribuição da população de pacientes resistentes aos GCs para diversas doenças imunológicas incluindo a AR. Esta informação pode ser útil para levar o paciente a uma terapia com GCs individualmente apropriada (Hirano *et al.* 2000). As diferenças na disposição celular ou tecidual dos GCs podem afetar a farmacodinâmica celular. Pequenas mudanças na estrutura química dos GCs podem conduzir a grandes diferenças na distribuição da droga, eliminação e ligação ao receptor (Szeffler 1990).

Sabe-se que a produção endógena de GCs é essencial para controlar as respostas imunológicas e surgimento de doenças auto-imunes. Por exemplo, ratos Lewis são hiporeativos ao estresse (produzem pouca corticosterona (CORT) quando estressados) e, por consequência, mais susceptíveis a uma ampla variedade de doenças auto-imunes inflamatórias. Os ratos Fisher, no entanto, são hiper-reativos ao estresse, mostram uma resposta hiper-ativa do eixo HPA, produzem muita CORT e são relativamente resistentes às mesmas doenças auto-imunes inflamatórias (Sternberg *et al.* 1989).

A resistência linfocitária a GCs não é exclusiva das doenças auto-imunes, mas pode também ser demonstrada em outras patologias importantes incluindo asma, depressão maior, colite ulcerativa e AIDS (Norbiato *et al.* 1992; Chan *et al.* 1998; Bauer *et al.* 2003; Travis 2004).

A sensibilidade aos GCs pode estar relacionada a resistência a múltiplas drogas (MDR). Existem muitos mecanismos de MDR, dentre esses, destaca-se a expressão de um transportador de membrana conhecido como glicoproteína-P (P-gp) (Beck *et al.* 1996; Linn *et al.* 1996; Advani *et al.* 1999; List *et al.* 2002).

### *1.5. Glicoproteína-P e polimorfismos genéticos do gene ABCB1*

A superfamília de proteínas dependente de ATP (ABC) apresenta diferentes transportadores expressados em vários organismos (Tirona & Kim 2002). Em humanos, 48 transportadores ABC têm sido identificados (Dean *et al.* 2001) e estão localizados na membrana plasmática ou em membranas intracelulares, transportando uma ampla variedade de substâncias incluindo íons, açúcares, aminoácidos, glicanos, peptídios, proteínas, fosfolipídios, toxinas e drogas (Tirona & Kim 2002).

Entre os diversos mecanismos de resistência a múltiplas drogas (MDR), a superexpressão da glicoproteína-P (P-gp), um produto com 170-kd do gene de resistência a múltiplas drogas (*ABCB1/MDR1*), tem sido relatado como a principal molécula envolvida no fenótipo MDR para várias doenças (Beck *et al.* 1996; Linn *et al.* 1996; Advani *et al.* 1999; List *et al.* 2002). Em humanos, existem 2 genes da família MDR (*ABCB1* e *ABCB4*), enquanto nos roedores existem 3 genes (*mdr1a*, *mdr1b* e *mdr2*) (Schinkel 1997).

O gene *ABCB1* está localizado na região cromossomal 7q21 e produz a P-gp, que é provavelmente um dos mais importantes transportadores ABC para a cinética de drogas em humanos, sendo considerada um mecanismo de proteção contra xenobióticos potencialmente tóxicos que são ingeridos na alimentação (Juliano & Ling 1976).

A P-gp funciona como uma bomba de fluxo transmembrana dependente de energia para diminuir a acumulação intracelular de uma variedade de drogas, como antitumorais, alcalóides, antraciclinas, verapamil, colchicina, antimaláricos, ciclosporina e GCs (Tsuruo 1983; Weinstein *et al.* 1990; Bourgeois *et al.* 1993; Higgins *et al.* 1997). A P-gp está envolvida tanto na proteção celular contra essas drogas quanto no desenvolvimento da resistência a elas (Tsujimura *et al.* 2005). Além disso, existem evidências que sugerem que a P-gp exerce um papel na atividade citolítica e na secreção de citocinas pelos linfócitos (Gupta *et al.* 1992; Drach *et al.* 1996; Raghu *et al.* 1996).

A P-gp é expressa por diferentes tecidos normais, sendo encontrada em células epiteliais, hepatócitos, células pancreáticas, e no tecido hematopoiético. Neste tecido, ela é expressa principalmente por linfócitos T, B e NK, bem como em células tronco (Chaudhary & Roninson 1991; Drach *et al.* 1992; Ludescher *et al.* 1998). As diferentes células hematopoiéticas mostram diferentes atividades da P-gp em função da idade, e estas mudanças podem ser responsáveis pelas características específicas do sistema imune em idosos (Machado *et al.* 2003).

As imunidades celular e humoral declinam progressivamente com a idade (Fernandes & Gupta 1981; Pilarski *et al.* 1995; Miller 1996). Linfócitos T de indivíduos idosos apresentam diminuição da proliferação *in vitro* em resposta a antígenos e mitógenos, bem como uma resposta citotóxica prejudicada e secreção anormal de citocinas. Já que a P-gp participa da função linfocitária (Gupta & Gollapudi 1993; Drach *et al.* 1996; Raghu *et al.* 1996), a atividade anormal da P-gp com a idade tem sido implicada na redução da função imune observada em indivíduos idosos.

O nível de expressão da proteína e a integridade funcional da P-gp afeta a interação farmacocinética com a administração terapêutica de drogas e por isso exerce um papel importante na eficácia e toxicidade do tratamento (Cascorbi *et al.* 2001). Estudos demonstram altos níveis da expressão da P-gp em pacientes com doença ativa, e que a super expressão da P-gp nos linfócitos está correlacionada com a falta da resposta aos GCs (Tsujimura *et al.* 2005). Esses dados sugerem que a atividade da doença e a expressão da P-gp estão correlacionadas com a resistência aos GCs no lúpus eritematoso sistêmico (Tsujimura *et al.* 2005). Outros relatam que a redução das concentrações citoplasmáticas de GCs são o resultado do aumento do fluxo de GCs mediado pela P-gp de linfócitos e é um dos mecanismos de resistência aos GCs em doença inflamatória do intestino e asma (Montano *et al.* 1996; Farrell & Kelleher 2003).

Quando o número de moléculas da P-gp expresso na superfície celular dos linfócitos aumenta, os GCs não conseguem chegar ao citoplasma, e isto pode resultar em resistência. Altos níveis da expressão da P-gp em linfócitos podem conduzir ao efluxo ativo de GCs do citoplasma para o exterior da célula, resultando não só no desenvolvimento da resistência, mas também no fracasso em controlar a atividade da doença em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com doença altamente ativa (Tsujimura *et al.* 2005).

O conhecimento do haplótipo do gene *ABCB1* em diferentes populações é importante para elucidar os mecanismos de identificação das associações entre polimorfismos representados por cada haplótipo, expressão e função da P-gp (Schwab *et al.* 2003). Diferenças individuais no controle transcricional do gene humano *ABCB1* (Muller 2000), incluindo variantes gênicos dos fatores de transcrição (Zhang *et al.* 2001), podem contribuir para a variabilidade da expressão da P-gp.

Vários estudos tratam a associação dos genótipos *ABCB1* com disposição dos substratos da P-gp em humanos. Estas investigações são baseadas na observação inicial que o genótipo *ABCB1* 3435TT está associado com baixa expressão da P-gp intestinal em humanos em comparação com indivíduos de genótipos 3435CT ou CC (Hoffmeyer *et al.* 2000).

A medida dos níveis da expressão de P-gp nos linfócitos é útil para a avaliação da resistência esteroideal e é um bom marcador para indicar a necessidade de uma terapia imunossupressora intensa em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico altamente ativa (Tsujimura *et al.* 2005).

A diferença na interação da P-gp com o cortisol e a CORT é extraordinária, considerando sua ampla similaridade na estrutura molecular. A P-gp apresenta um amplo espectro de substratos, mas a CORT somente difere do cortisol pela falta do grupo 17-hidroxil (Karssen *et al.* 2001). Existem indicações de que ambos os grupos 17-hidroxil e 11-hidroxil determinam a habilidade dos esteróides serem transportados pela P-gp (Bourgeois *et al.* 1993). A P-gp transporta esteróides tendo ambos estes grupos hidroxil, se os esteróides perdem um destes grupos estão provavelmente diminuindo seu transporte (Karssen *et al.* 2001).

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Advani R, Visani G, Milligan D, Saba H, Tallman M, Rowe JM, Wiernik PH, Ramek J, Dugan K, Lum B, Villena J, Davis E, Paietta E, Litchman M, Covelli A, Sikic B, Greenberg P (1999) Treatment of poor prognosis AML patients using PSC833 (valsopodar) plus mitoxantrone, etoposide, and cytarabine (PSC-MEC). *Adv Exp Med Biol* **457**, 47.
- Almawi WY, Tamim H (2001) Posttranscriptional mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: glucocorticoids inhibit IL-6-induced proliferation of B9 hybridoma cells. *Cell Transplant* **10**, 161.
- Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS (2000) Glucocorticoids in T cell development and function\*. *Annu Rev Immunol* **18**, 309.
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmsberg A, Karin M (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* **270**, 286.
- Bauer ME, Papadopoulos A, Poon L, Perks P, Lightman SL, Checkley S, Shanks N (2003) Altered glucocorticoid immunoregulation in treatment resistant depression. *Psychoneuroendocrinology* **28**, 49.
- Beck WT, Grogan TM, Willman CL, Cordon-Cardo C, Parham DM, Kuttesch JF, Andreeff M, Bates SE, Berard CW, Boyett JM, Brophy NA, Broxterman HJ, Chan HS, Dalton WS, Dietel M, Fojo AT, Gascoyne RD, Head D, Houghton PJ, Srivastava DK, Lehnert M, Leith CP, Paietta E, Pavelic ZP, Weinstein R (1996) Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. *Cancer Res* **56**, 3010.
- Bourgeois S, Gruol DJ, Newby RF, Rajah FM (1993) Expression of an mdr gene is associated with a new form of resistance to dexamethasone-induced apoptosis. *Mol Endocrinol* **7**, 840.
- Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR (2004) Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum* **50**, 3408.
- Cancedda C, Filaci G, Puppo F, Ghio M, Contini P, Indiveri F (2002) Immune homeostasis requires several biologic factors including glucocorticoid hormones. *Ann N Y Acad Sci* **966**, 49.
- Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I (2001) Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* **69**, 169.
- Chan MT, Leung DY, Szeffler SJ, Spahn JD (1998) Difficult-to-control asthma: clinical characteristics of steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* **101**, 594.
- Chaudhary PM, Roninson IB (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* **66**, 85.
- Chikanza IC, Grossman AB (2000) Reciprocal interactions between the neuroendocrine and immune systems during inflammation. *Rheum Dis Clin North Am* **26**, 693.
- Chikanza IC, Kozaci D, Chernajovsky Y (2003) The molecular and cellular basis of corticosteroid resistance. *J Endocrinol* **179**, 301.
- Chikanza IC, Kozaci DL (2004) Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives. *Rheumatology (Oxford)* **43**, 1337.



- Chikanza LC, Panayi GS (1993) The effects of hydrocortisone on in vitro lymphocyte proliferation and interleukin-2 and -4 production in corticosteroid sensitive and resistant subjects. *Eur J Clin Invest* **23**, 845.
- Collaziol D, Luz C, Dornelles F, da Cruz IM, Bauer ME (2004) Psychoneuroendocrine correlates of lymphocyte subsets during healthy ageing. *Mech Ageing Dev* **125**, 219.
- Corkill MM, Kirkham BW, Chikanza IC, Gibson T, Panayi GS (1990) Intramuscular depot methylprednisolone induction of chrysotherapy in rheumatoid arthritis: a 24-week randomized controlled trial. *Br J Rheumatol* **29**, 274.
- Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ (2000) Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol* **130**, 289.
- de Castro M, Elliot S, Kino T, Bamberger C, Karl M, Webster E, Chrousos GP (1996) The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol Med* **2**, 597.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**, 1007.
- del Rincon I, O'Leary DH, Haas RW, Escalante A (2004) Effect of glucocorticoids on the arteries in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **50**, 3813.
- Dhabhar FS, McEwen BS (1999) Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1059.
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G (2001) Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* **193**, 1303.
- Doran MF, Pond GR, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE (2002) Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, over a forty-year period. *Arthritis Rheum* **46**, 625.
- Drach D, Zhao S, Drach J, Mahadevia R, Gattringer C, Huber H, Andreeff M (1992) Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. *Blood* **80**, 2729.
- Drach J, Gsur A, Hamilton G, Zhao S, Angerler J, Fiegl M, Zojer N, Raderer M, Haberl I, Andreeff M, Huber H (1996) Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes. *Blood* **88**, 1747.
- Encio IJ, Detera-Wadleigh SD (1991) The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **266**, 7182.
- Farrell RJ, Kelleher D (2003) Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J Endocrinol* **178**, 339.
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN (1996) Rheumatoid arthritis. *Cell* **85**, 307.
- Fernandes G, Gupta S (1981) Natural killing and antibody-dependent cytotoxicity by lymphocyte subpopulations in young and aging humans. *J Clin Immunol* **1**, 141.
- Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, Louis E, Dewe W, Chrousos GP, Belaiche J, Geenen V (1999) Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 2834.
- Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, O'Shea JJ, Chrousos GP, Bornstein SR (2002) Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *Faseb J* **16**, 61.

- Gold R, Buttgerit F, Toyka KV (2001) Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol* **117**, 1.
- Gupta S, Gollapudi S (1993) P-glycoprotein (MDR 1 gene product) in cells of the immune system: its possible physiologic role and alteration in aging and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. *J Clin Immunol* **13**, 289.
- Gupta S, Kim CH, Tsuruo T, Gollapudi S (1992) Preferential expression and activity of multidrug resistance gene 1 product (P-glycoprotein), a functionally active efflux pump, in human CD8+ T cells: a role in cytotoxic effector function. *J Clin Immunol* **12**, 451.
- Hearing SD, Norman M, Smyth C, Foy C, Dayan CM (1999) Wide variation in lymphocyte steroid sensitivity among healthy human volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 4149.
- Heijnen CJ, Kavelaars A (1999) The importance of being receptive. *J Neuroimmunol* **100**, 197.
- Higgins CF, Callaghan R, Linton KJ, Rosenberg MF, Ford RC (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Semin Cancer Biol* **8**, 135.
- Hirano T, Tsuboi N, Homma M, Oka K, Takekoshi T, Tahara K, Takanashi H, Abe H, Urata Y, Hayashi T (2000) Comparative study of lymphocyte-suppressive potency between prednisolone and methylprednisolone in rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology* **49**, 411.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3473.
- Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH (2001) Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* **193**, 1285.
- Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**, 152.
- Karssen AM, Meijer OC, van der Sandt IC, Lucassen PJ, de Lange EC, de Boer AG, de Kloet ER (2001) Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain. *Endocrinology* **142**, 2686.
- Kim JM, Weisman MH (2000) When does rheumatoid arthritis begin and why do we need to know? *Arthritis Rheum* **43**, 473.
- Kirkham BW, Corkill MM, Davison SC, Panayi GS (1991) Response to glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis: in vitro cell mediated immune assay predicts in vivo responses. *J Rheumatol* **18**, 821.
- Koetz K, Bryl E, Spickschen K, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand CM (2000) T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9203.
- Langhoff E, Ladefoged J, Jakobsen BK, Platz P, Ryder LP, Svejgaard A, Thaysen JH (1986) Recipient lymphocyte sensitivity to methylprednisolone affects cadaver kidney graft survival. *Lancet* **1**, 1296.
- Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG (2001) Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* **193**, 1295.

- Linn SC, Honkoop AH, Hoekman K, van der Valk P, Pinedo HM, Giaccone G (1996) p53 and P-glycoprotein are often co-expressed and are associated with poor prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* **74**, 63.
- List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Slovak ML, Douer D, Dakhil SR, Appelbaum FR (2002) Cyclosporine inhibition of P-glycoprotein in chronic myeloid leukemia blast phase. *Blood* **100**, 1910.
- Ludescher C, Pall G, Irschick EU, Gastl G (1998) Differential activity of P-glycoprotein in normal blood lymphocyte subsets. *Br J Haematol* **101**, 722.
- Machado CG, Calado RT, Garcia AB, Falcao RP (2003) Age-related changes of the multidrug resistance P-glycoprotein function in normal human peripheral blood T lymphocytes. *Braz J Med Biol Res* **36**, 1653.
- Malaguarnera L, Ferlito L, Di Mauro S, Imbesi RM, Scalia G, Malaguarnera M (2001) Immunosenescence and cancer: a review. *Arch Gerontol Geriatr* **32**, 77.
- Manolios N, Bakiera B, Geczy CL, Schrieber L (1991) Arachidonic acid metabolites in normal and autoimmune mice do not influence lymphocyte-high endothelial venule interactions. *Immunol Cell Biol* **69 (Pt 1)**, 39.
- Miller RA (1996) The aging immune system: primer and prospectus. *Science* **273**, 70.
- Montano E, Schmitz M, Blaser K, Simon HU (1996) P-glycoprotein expression in circulating blood leukocytes of patients with steroid-resistant asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol* **6**, 14.
- Muller M (2000) Transcriptional control of hepatocanalicular transporter gene expression. *Semin Liver Dis* **20**, 323.
- Norbiato G, Bevilacqua M, Vago T, Baldi G, Chebat E, Bertora P, Moroni M, Galli M, Oldenburg N (1992) Cortisol resistance in acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **74**, 608.
- Onda K, Rimbara E, Hirano T, Oka K, Abe H, Tahara K, Takanashi H, Tsuboi N, Niitsuma T, Hayashi T (2004) Role of mRNA expression of transcription factors in glucocorticoid sensitivity of peripheral blood mononuclear cells and disease state in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **31**, 464.
- Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fulop T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R (2002) T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci* **7**, d1056.
- Pilarski LM, Paine D, McElhaney JE, Cass CE, Belch AR (1995) Multidrug transporter P-glycoprotein 170 as a differentiation antigen on normal human lymphocytes and thymocytes: modulation with differentiation stage and during aging. *Am J Hematol* **49**, 323.
- Pitzalis C, Pipitone N, Perretti M (2002) Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci* **966**, 108.
- Postigo AA, Garcia-Vicuna R, Diaz-Gonzalez F, Arroyo AG, De Landazuri MO, Chi-Rosso G, Lobb RR, Laffon A, Sanchez-Madrid F (1992) Increased binding of synovial T lymphocytes from rheumatoid arthritis to endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Clin Invest* **89**, 1445.
- Raghu G, Park SW, Roninson IB, Mechetner EB (1996) Monoclonal antibodies against P-glycoprotein, an MDR1 gene product, inhibit interleukin-2 release from PHA-activated lymphocytes. *Exp Hematol* **24**, 1258.
- Refojo D, Liberman AC, Holsboer F, Arzt E (2001) Transcription factor-mediated molecular mechanisms involved in the functional cross-talk between cytokines and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol* **79**, 385.

- Schacke H, Docke WD, Asadullah K (2002) Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* **96**, 23.
- Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS, Jr. (1995) Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* **270**, 283.
- Schinkel AH (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* **8**, 161.
- Schlaghecke R, Beuscher D, Kornely E, Specker C (1994) Effects of glucocorticoids in rheumatoid arthritis. Diminished glucocorticoid receptors do not result in glucocorticoid resistance. *Arthritis Rheum* **37**, 1127.
- Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (2003) Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 285.
- Smolen JS, Aletaha D, Machold KP (2005) Therapeutic strategies in early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **19**, 163.
- Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F (2001) Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* **31**, 1247.
- Sternberg EM (2001) Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J Endocrinol* **169**, 429.
- Sternberg EM, Young WS, 3rd, Bernardini R, Calogero AE, Chrousos GP, Gold PW, Wilder RL (1989) A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 4771.
- Straub RH, Scholmerich J, Cutolo M (2003) The multiple facets of premature aging in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 2713.
- Szefer SJ (1990) Measuring the response to glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol* **85**, 985.
- Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN (2001) Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* **31**, 1122.
- Taams LS, Vukmanovic-Stejić M, Smith J, Dunne PJ, Fletcher JM, Plunkett FJ, Ebeling SB, Lombardi G, Rustin MH, Bijlsma JW, Lafeber FP, Salmon M, Akbar AN (2002) Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* **32**, 1621.
- Thomas R, MacDonald KP, Pettit AR, Cavanagh LL, Padmanabha J, Zehntner S (1999) Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Leukoc Biol* **66**, 286.
- Tirona RG, Kim RB (2002) Pharmacogenomics of organic anion-transporting polypeptides (OATP). *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 1343.
- Travis SP (2004) Predicting outcome in severe ulcerative colitis. *Dig Liver Dis* **36**, 448.
- Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y (2005) Clinical relevance of the expression of P-glycoprotein on peripheral blood lymphocytes to steroid resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **52**, 1676.
- Tsuruo T (1983) Reversal of acquired resistance to vinca alkaloids and anthracycline antibiotics. *Cancer Treat Rep* **67**, 889.
- van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS (2004) CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* **50**, 2775.

- Vingerhoeds AC, Thijssen JH, Schwarz F (1976) Spontaneous hypercortisolism without Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **43**, 1128.
- Wan Y, Nordeen SK (2002) Identification of genes differentially regulated by glucocorticoids and progestins using a Cre/loxP-mediated retroviral promoter-trapping strategy. *J Mol Endocrinol* **28**, 177.
- Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM (2002) Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* **20**, 125.
- Weinstein RS, Kuszak JR, Kluskens LF, Coon JS (1990) P-glycoproteins in pathology: the multidrug resistance gene family in humans. *Hum Pathol* **21**, 34.
- Weyand CM (2000) New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **39 Suppl 1**, 3.
- Weyand CM, Goronzy JJ (2002) Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **29**, 1141.
- Wilckens T, De Rijk R (1997) Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol Today* **18**, 418.
- Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Wrighton SA, Hancock M, Kim RB, Strom S, Thummel K, Russell CG, Hudson JR, Jr., Schuetz EG, Boguski MS (2001) The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics* **11**, 555.

### **3. OBJETIVOS**

#### *3.1. Geral*

Avaliar a resposta imune celular de pacientes com artrite reumatóide, controles saudáveis e sua relação com a sensibilidade linfocitária a glicocorticóides *in vitro*.

#### *3.2. Específicos*

- Analisar a proliferação de células T estimuladas por mitógeno.
- Investigar a sensibilidade das células T a glicocorticóides (DEX e CORT).
- Analisar a atividade funcional da P-gp linfocitária.
- Investigar a relação dos polimorfismos MDR e a expressão da P-gp.
- Comparar todas as variáveis estudadas em relação (a) faixas etárias, (b) diferentes intervenções terapêuticas.

#### 4. ARTIGO CIENTÍFICO

---

Este artigo será submetido à *Clinical and Experimental Immunology*

### IS STEROID RESISTANCE ASSOCIATED WITH MULTIDRUG RESISTANCE-I (MDR-I) IN RHEUMATOID ARTHRITIS?

L.C. BOROWSKI<sup>a</sup>, R.P. LOPES<sup>a</sup>, T.P. GONZALEZ<sup>c</sup>, L.A. DUMMER<sup>c</sup>, J.A.B. CHIES<sup>c</sup>,  
I.G. SILVEIRA<sup>d</sup>, M. KEISERMANN<sup>d</sup> and M.E. BAUER<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> *Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Av. Ipiranga 6690, 2º andar, Caixa Postal 1429, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil*

<sup>b</sup> *Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, Brazil*

<sup>c</sup> *Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil*

<sup>d</sup> *Ambulatório de Reumatologia, Hospital São Lucas, PUCRS, Porto Alegre, Brazil*

**Corresponding author:** Dr Moisés E. Bauer, Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Hospital São Lucas - PUCRS, Av. Ipiranga 6690, 2º andar – P.O. Box 1429. 90.610-000 Porto Alegre, RS. Brazil. Phone: +55 51 3320 00/x27233203312. **Email:** [mebauer@pucrs.br](mailto:mebauer@pucrs.br)

## Summary

Both aging and rheumatoid arthritis (RA) are frequently associated with acquired steroid resistance. Here, we investigated if GC resistance is associated with multidrug resistance (MDR). Seventy-four RA patients and 26 healthy controls took part in this study. Peripheral blood mononuclear cells were isolated and T-cell sensitivity to GCs was measured *in vitro*. Functional activity of P-glycoprotein, a pump molecule that decreases intracellular drug concentrations by increasing drug efflux, was assessed in peripheral lymphocytes as well as *ABCB1/MDR-1* gene polymorphism. Patients and controls had similar sensitivities to GCs. Non-stimulated cells of middle-aged patients were more sensitive to dexamethasone than young or elderly subjects. Patients had a higher percentage of lymphocytes extruding rhodamine 123 (Rh123<sup>dim</sup>) than controls in spite of similar P-glycoprotein activity. The distribution of *ABCB1* genotypes in RA patients did not differ significantly from that in controls. These data suggest that peripheral lymphocytes of arthritic patients are fully responsive to GCs *in vitro* and present higher extrusion of drugs in spite of normal P-gp function.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, glucocorticoids, P-glycoprotein, lymphocyte proliferation, polymorphisms, *ABCB1/MDR1*.



## 5. Introduction

The rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease associated with synovial inflammation characterized by lymphocyte infiltration [1] that damages bones and cartilages and eventually leads to destruction of joints [2]. The treatment of RA patients includes anti-inflammatory drugs, immunosuppressors, anti-malarics and cytokine inhibitors [3]. Of special note, the glucocorticoids (GCs) have been commonly used as powerful anti-inflammatory drugs for the treatment of RA, asthma, systemic lupus erythematosus, leukemias, lymphomas and transplant rejection [4, 5]. However, chronic GC treatment is associated with acquired steroid resistance [6, 7]. There is some data suggesting that RA patients develop GC resistance, requiring greater drug amounts and/or extended period of treatment [6, 7]. However, there is considerable debate over this finding since others have found cells with increased sensitivity to steroids in RA [8]. These discrepancies could be explained by disease-modifying factors including age and severity of disease [9]. Indeed, we have recently described that healthy aging is associated with significant T-cell resistance to GC treatment [10]. However, the impact of the pathological aging on this GC immunoregulation is largely unknown. This information can be useful for a more individual-oriented therapy [11].

To date, it is unknown to what extent the steroid resistance is associated with resistance to other drugs. Classic multidrug resistance (MDR) is characterized by the expression of the *ABCB1* gene, which encodes for a transmembrane protein P-glycoprotein (P-gp). This protein functions as an efflux pump to decrease the intracellular accumulation of a variety of lipophilic drugs, including chloroquine, immunosuppressors and GCs [12, 13]. Little is known about the possible role of P-gp in inflammatory and autoimmune diseases

that require therapy with drugs actively extruded by this transporter. There is some evidence that increased P-gp activity in lymphocytes from systemic lupus erythematosus [14] and RA [15] might influence disease outcome or steroid requirements for disease control. Some genetic polymorphisms of the *ABCB1* gene have been described and are associated with disposition of P-gp substrates in humans [16, 17]. However, the association of the polymorphisms *ABCB1* gene and expression and function of P-gp is largely unknown.

In this study, we investigated (i) the potential involvement of steroid resistance with MDR and (ii) to further explore the age-related effects on lymphocyte sensitivity to GCs in peripheral blood.

## **6. Materials and Methods**

### *6.1. Subjects*

Seventy-four patients with RA (mean age  $53.04 \pm 1.79$ ) were recruited from the Rheumatology Unit (São Lucas Hospital, Porto Alegre, Brazil). Patients were sub grouped accordingly to the following age ranges: young adults (20-40 yrs; n = 16), middle-aged (41-60 yrs; n = 31) and elderly (>60 yrs; n = 27). The diagnosis of RA was made according to the criteria of the American College of Rheumatology [18]. In addition, 26 age-matched healthy control subjects (20-79 yrs; mean age  $45.08 \pm 3.32$ ) also took part in this study and included health care workers, undergraduates and local community dwellers. Exclusion criteria included infections, heart disease, under nourishment, anemia, leucopenia, neoplasia, major depression, HIV, pathology of tireoid and diabetes. The study protocol was approved by both scientific and ethics committees (Pontifical Catholic University of Rio

Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brazil) and written informed consent was obtained from all subjects.

### *6.2. Collection of peripheral blood and isolation of mononuclear cells*

Twenty milliliters of peripheral blood was collected by venepuncture in the morning (between 9–10 h) and samples stored into lithium-heparin tubes prior to analyses. Samples were always collected at the same time of day to minimize circadian variations. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by centrifugation over a Ficoll-Hypaque (Sigma) gradient (900 g, 30 min). Cells were counted by means of microscopy (100 x) and viability always exceeded 95%, as judged from their ability to exclude trypan blue (Sigma).

### *6.3. Cell cultures and steroid sensitivity assays*

PBMCs were cultured in flat bottomed 96-well microplates in a final concentration of  $1.5 \times 10^5$  cells/well in complete culture medium (i.e. supplemented with gentamicin 0.5%, glutamine 1%, fungizone 0.1%, HEPES 1% and heat-inactivated fetal calf serum 10%, all from Sigma) for 96h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Stimulation by the selective T-cell mitogen phytohemagglutinin (PHA 2, 1 and 0.5%; Gibco, USA) was performed in triplicates (100 µL/well). In non-stimulated cultures (PHA 0), mitogen was substituted by culture medium. To assess *in vitro* T-cell sensitivity to steroids, DEX (a synthetic type II steroid receptor agonist), and corticosterone (CORT, binds to both types of steroid receptors) were added in duplicates ( $10^{-9}$  to  $10^{-4}$  M; all from Sigma) to mitogen-stimulated (PHA 1%) lymphocyte cultures. Glucocorticoid concentrations were used in a range that free endogenous GCs would reach during resting state ( $10^{-9}$  M), stress ( $10^{-6}$  M) and under pharmacological treatment ( $10^{-5}$  M) *in vivo*. Data are presented as percentage of basal prolifera-

tion, where 100% (basal) represents cultures of PHA 1% without steroids. The drug concentration that provided 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) of lymphocyte proliferation was estimated by non-linear regression (Prism 4.0, Graphpad software, USA). A sigmoidal dose-response equation was chosen to fit the data ( $R^2$  higher than 0.95).

#### 6.4. Cell proliferation/viability assay

The proliferative responses were determined by a modified colorimetric assay [19, 20]. In the last 4 h of culture, 100  $\mu$ L of the supernatant was gently discarded and 40  $\mu$ L of freshly prepared MTT (3-(4,5-diamethyl 2-thiazolyl) 2,5 diphenyl-2H-tetrazolium, Sigma) solution (5 mg/mL in RPMI-1640) was added to each well. The dehydrogenase enzymes in metabolically active cells convert this substrate to formazan, producing a dark blue precipitate. The cell cultures were incubated for 4h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After completely removal of the supernatant, 100  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (Sigma) was added to each well. The optical density (OD) was determined using Biorad ELISA plate reader at a wavelength of 570 and 630 nm. Proliferation/viability was expressed as  $\Delta$ OD (OD of stimulated – OD of nonstimulated cultures).

#### 6.5. Steroid responsiveness

Glucocorticoid responders and non-responders were identified through analysis of dose-response curves of control samples cultured with DEX or CORT. The area under the curve (AUC) was calculated by the trapezoidal rule. Patients with AUC DEX higher than the median (403.55 for young patients, 396.20 for middle age and 394.70 for aged) were classified as GC non-responders, while patients with an AUC lower than this value were considered sensitive to DEX *in vitro* and were classified as responders. Patients with AUC CORT higher than the median (437 for young patients, 421 for middle age and 478.60 for

aged) were classified as GC non-responders, while patients with an AUC lower than this value were considered sensitive to CORT *in vitro* and were classified as responders.

#### 6.6. Rhodamine 123-efflux assay

The P-gp activity was determined by efflux of Rhodamine 123 (Rh123, Sigma), a fluorescent dye that is a substrate for P-gp and is pumped out cell. The PBMCs were resuspended in complete RPMI-1640 medium in the final concentration  $5 \times 10^6$  cells/mL and incubated twice with Rh123 (200 ng/mL) in the presence or absence of 50 mM verapamil (a P-gp inhibitor; Sigma) for 30 min at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After each incubation, cells were washed (2X) with PBS. Immunofluorescence was performed using a flow cytometer (FACScalibur, BD Pharmingen, USA). The Rh123 efflux index was calculated on the basis of the ratio of mean fluorescence intensity for Rh123 in Rh123 + verapamil/Rh123, accordingly to previous work [21].

#### 6.7. ABCB1 genotyping

Peripheral blood samples (2 mL) from RA patients and healthy subjects were collected for genomic DNA, which was executed using the method described by Lahiri & Nurnberger [22] and screened for the single nucleotide polymorphisms (SNPs) using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assays. Genotyping of the polymorphisms *ABCB1* was performed as previously described for C1236T and G2677T/A [23] and C3435T [24] polymorphisms.

#### 6.8. Statistical analysis

All variables were tested for normality of distribution by means of the Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons between groups and treatments were done by two-way

repeated measures ANOVA that included two between-subjects variables and one within-subjects variable. Multiple comparisons among levels were checked with Tukey post hoc test. The differences between independent-samples were analyzed with T test. The proportions differences between groups were analyzed by contingency test  $\chi^2$ . Interrelationships between variables were analyzed by Pearson's correlation test. The significance level was  $\alpha = 0.05$  (two-tailed) and a computer statistics software (SPSS 11.5, USA) was used for statistical analysis. Data are expressed as mean  $\pm$  SE.

## **7. Results**

### *7.1. Demographic data and clinical characteristics*

Demographic and clinical characteristics of RA patients are shown in table 1. To investigate the impact of aging in the RA, patients were sub grouped in three age ranges: young adults (20-40 yrs), middle-aged (41-60 yrs) and elderly (> 60 yrs). The duration of disease was found highest in the elderly group ( $p < 0.001$ ), as expected. All patients were taken different drugs that included disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), glucocorticoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Drug regimen as well as the remaining clinical variables was found similarly distributed among different age subgroups.

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of the RA patients

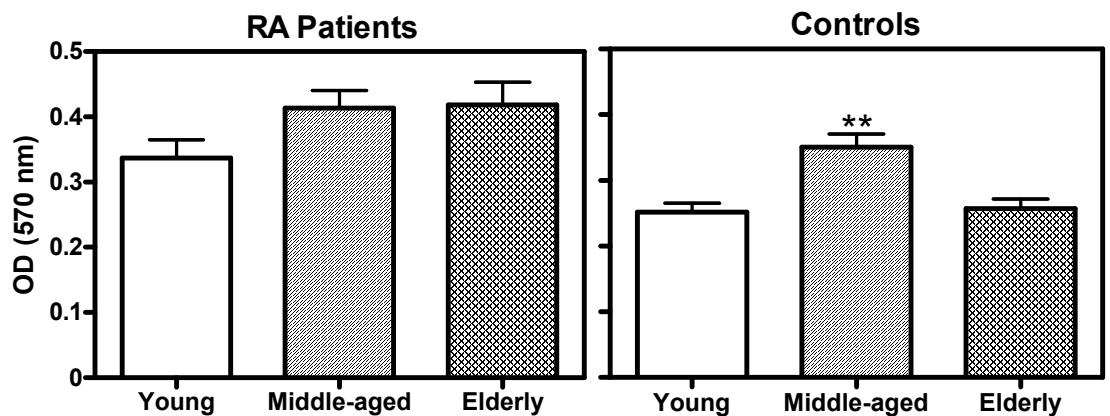
| <b>Factors</b>          | <b>Young<br/>(n = 16)</b> | <b>Middle-aged<br/>(n = 31)</b> | <b>Elderly<br/>(n = 27)</b> |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Age (yrs)               | 30.62 ± 1.64              | 50.97 ± 1.05                    | 68.70 ± 1.08***             |
| Males/females           | 1/15                      | 5/26                            | 6/21                        |
| BMI                     | 24.96 ± 1.31              | 26.34 ± 0.79                    | 25.42 ± 0.92                |
| RA duration (yrs)       | 5.87 ± 1.44               | 12 ± 1.11                       | 15.56 ± 2.24***             |
| Serum CRP (mg/L)        | 4.80 ± 3.16               | 1.61 ± 0.47                     | 0.96 ± 0.15                 |
| ESR (mm/h)              | 34.19 ± 7.83              | 22.20 ± 4.08                    | 24.54 ± 3.57                |
| No. RF positive         | 9                         | 20                              | 22                          |
| Morning stiffness (n)   | 11                        | 23                              | 20                          |
| Lymphocytes (counts/mL) | 2604.00 ± 2.92            | 2362.00 ± 1.86                  | 2096.00 ± 1.75              |
| Treatment               |                           |                                 |                             |
| DMARDs, n (%)           | 14 (87.5)                 | 27 (87.1)                       | 24 (88.9)                   |
| NSAIDs, n (%)           | 7 (43.8)                  | 14 (45.2)                       | 8 (29.6)                    |
| Corticosteroids, n (%)  | 12 (75)                   | 30 (96.8)                       | 22 (81.5)                   |

BMI = body mass index; RA = rheumatoid arthritis; CRP = C-reactive protein; ESR = erythrocyte sedimentation rate; RF = rheumatoid factor; DMARDs = disease-modifying antirheumatic drugs; NSAIDs = nonsteroidal antiinflammatory drugs. Statistical differences: \*\*\* < 0.0001.

### *7.2. Lymphocyte proliferation and sensitivity to glucocorticoids*

We evaluated the spontaneous and mitogen-induced lymphocyte proliferation as index of cell-mediated immunity. The spontaneous (basal) proliferation/viability of PBMCs was found increased in RA patients compared to controls ( $0.39 \pm 0.02$  vs  $0.29 \pm 0.01$ , re-

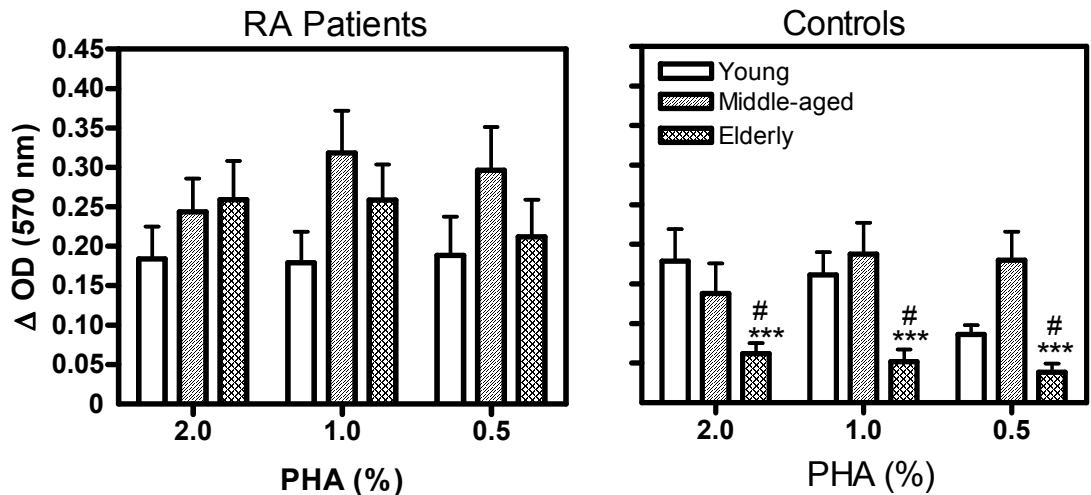
spectively),  $F(1,94) = 10.33$ ,  $p = 0.002$ . Significant age-related effects were observed in the control group,  $F(2,25) = 10.74$ ,  $p = 0.001$ . A higher basal proliferation/viability was observed in the middle-aged group when compared to young ( $p < 0.001$ ) or elders ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1). This age-related effect was not observed for RA patients.



**Fig. 1.** Non-stimulated proliferation/viability. Statistically significant differences are indicated: \*\* $p < 0.01$ .

RA patients had significant higher (54%) proliferative responses when compared to healthy controls,  $F(1,62) = 7.03$ ,  $p < 0.01$ . In addition, we observed significant age-related changes for the control group,  $F(1,19) = 11.38$ ,  $p < 0.001$ . In particular, elders presented blunted T-cell responses when compared to middle-aged or young subjects (Fig. 2). This cogent aging effect was not observed for the RA patients ( $p = 0.83$ ).





**Fig. 2.** Mitogen-induced T-cell proliferation. Statistically significant differences are indicated: \*\*\*  $p = 0.004$  vs. young and #  $p = 0.001$  vs. middle-aged.

In view of evidence that healthy aging [10] and RA [6, 7] are associated with GC resistance, we also evaluated the peripheral lymphocyte sensitivity to steroids across different age groups. This was explored by analyzing the ability of GCs in suppressing T-cell proliferation/viability *in vitro*. First, we analyzed the sensitivity of non-stimulated PBMCs to DEX, a synthetic GC that is actively extruded by P-gp. Non-stimulated PBMCs are largely refractory to GC treatment. PBMCs of RA patients and controls responded similarly to DEX treatment (Fig. 3),  $F(1,84) = 0.67$ ,  $p = 0.41$ . There was an age effect for the group of RA patients, although this only approached statistical significance,  $F(2,62) = 2.77$ ,  $p = 0.07$ . In particular, non-stimulated PBMCs of middle-aged patients (~26.14% of suppression) were more sensitive than young (~14.28% of suppression) or elderly subjects (~19.37% of suppression). This was not observed for the healthy controls,  $F(2,22) = 0.47$ ,  $p = 0.63$ .

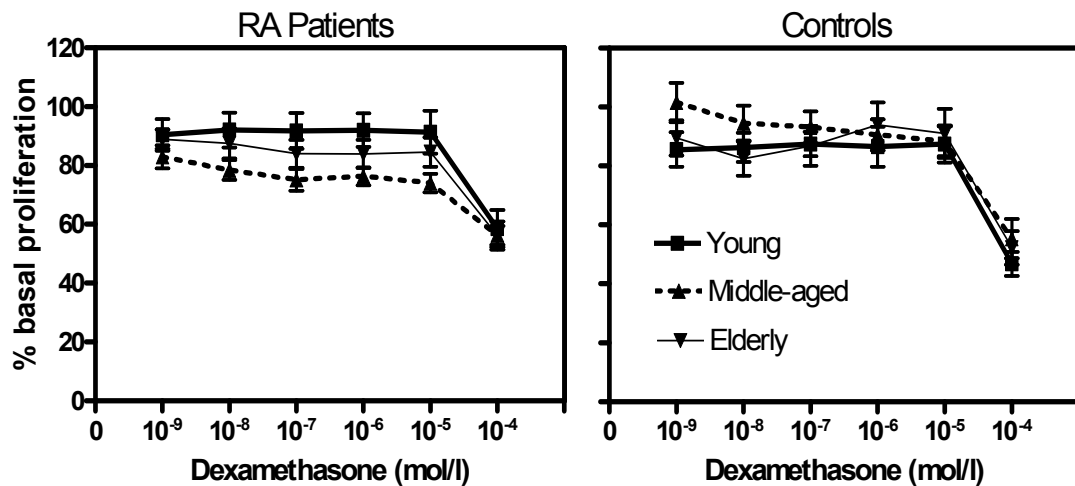
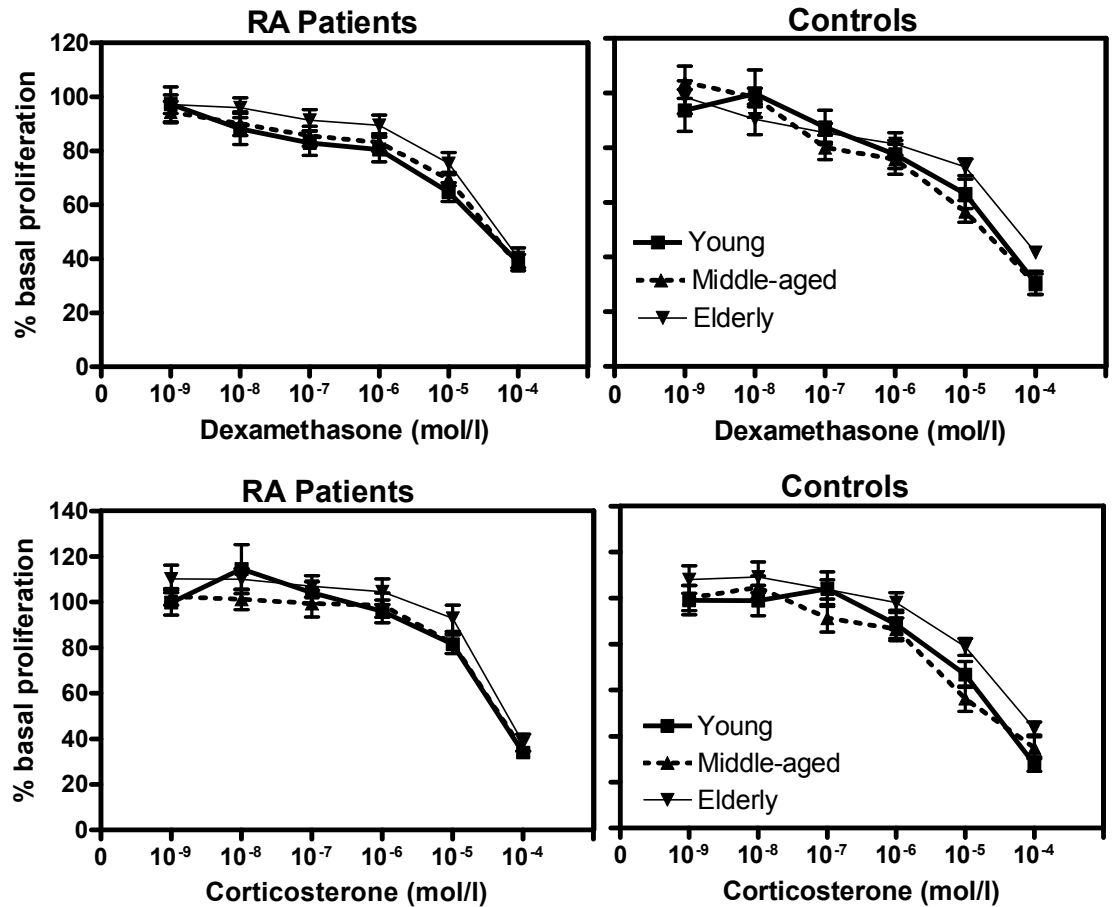


Fig. 3. Non-stimulated PBMCs sensitivity to DEX in patients and controls.

We also evaluated the stimulated T-cell sensitivity to DEX and CORT (i.e. a natural GC that is not extruded by P-gp). These GCs produced significant dose-dependent suppression of T-cell proliferation (both  $p < 0.0001$ ). These data highlight the efficacy of these steroids in suppressing *in vitro* proliferation. We found similar T-cell sensitivities to DEX and CORT between RA patients and controls,  $p = 0.72$  and  $p = 0.14$  respectively. Age produced no changes on cellular sensitivities to DEX and CORT,  $p = 0.57$  and  $p = 0.16$  respectively (Fig. 4).



**Fig. 4.** Peripheral T-cell sensitivities to DEX and CORT. Glucocorticoid sensitivity was assessed by incubating PBMCs with PHA 1% and increasing concentrations of GCs. Data are shown as percentage of basal proliferation (100% = PHA 1% without steroids).

We then investigated the frequency of GC responders and non-responders of DEX/CORT within RA patients. We found no significant differences between the frequency of GC responders/non-responders to DEX ( $\chi^2 = 3.83$ ,  $p = 0.15$ ) or CORT ( $\chi^2 = 1.53$ ,  $p = 0.47$ ) across age groups (Table 2). We have also compared the T-cell sensitivity to GCs *in vitro* between patients under or not GC treatment *in vivo*. However, we found no significant differences between these groups (data not shown).

**Table 2.** Frequency of DEX and CORT responsiveness of RA patients

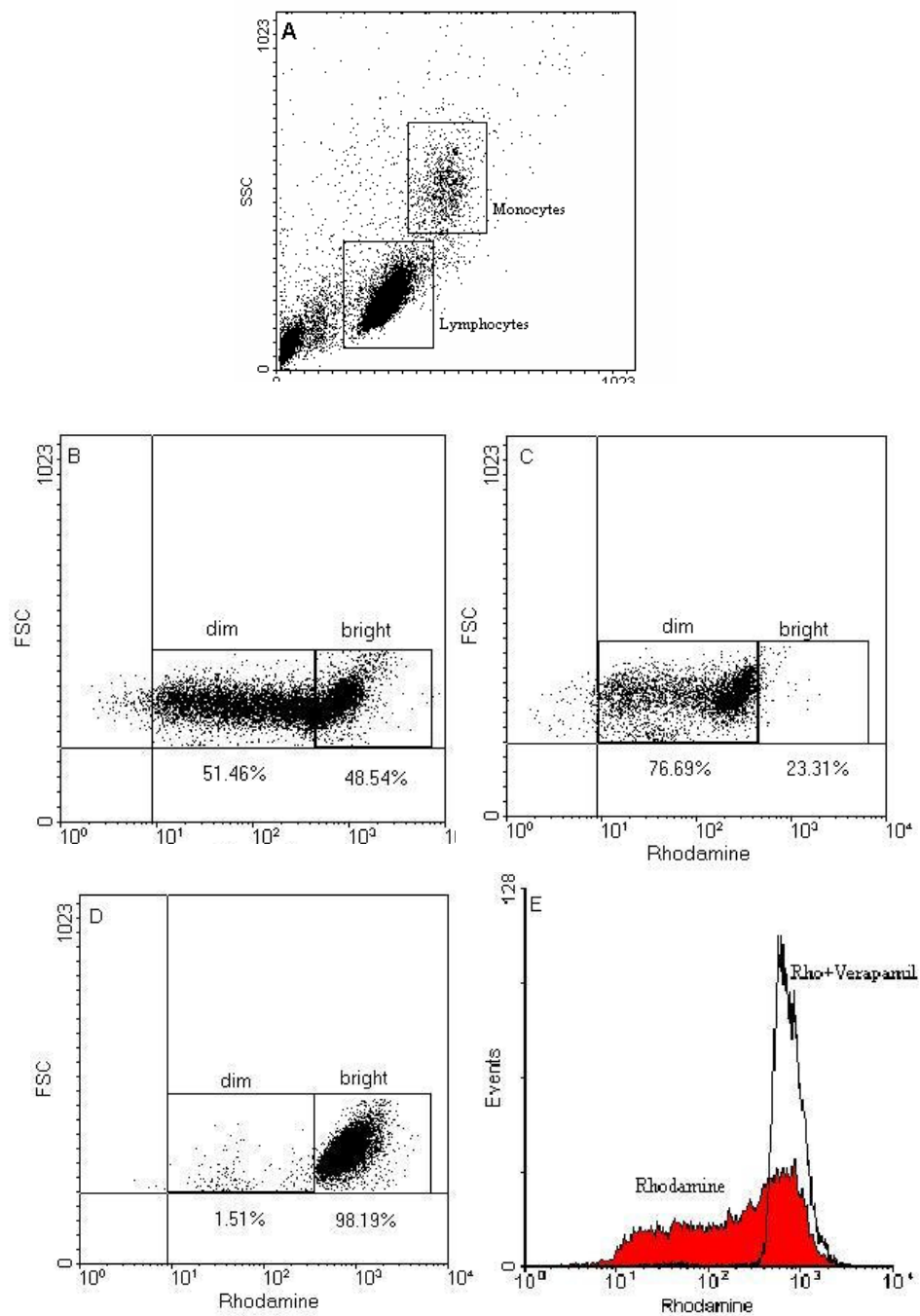
|                            | <b>Young</b> | <b>Middle-aged</b> | <b>Elderly</b> |
|----------------------------|--------------|--------------------|----------------|
| <i>DEX responders</i>      |              |                    |                |
| Frequency                  | 10           | 16                 | 9              |
| Percent                    | 62.5         | 51.6               | 33.3           |
| <i>DEX non-responders</i>  |              |                    |                |
| Frequency                  | 6            | 15                 | 18             |
| Percent                    | 37.5         | 48.4               | 66.7           |
| <i>CORT responders</i>     |              |                    |                |
| Frequency                  | 7            | 10                 | 12             |
| Percent                    | 43.8         | 32.3               | 48             |
| <i>CORT non-responders</i> |              |                    |                |
| Frequency                  | 9            | 21                 | 13             |
| Percent                    | 56.3         | 67.7               | 52             |

### 7.3. Functional activity of P-glycoprotein

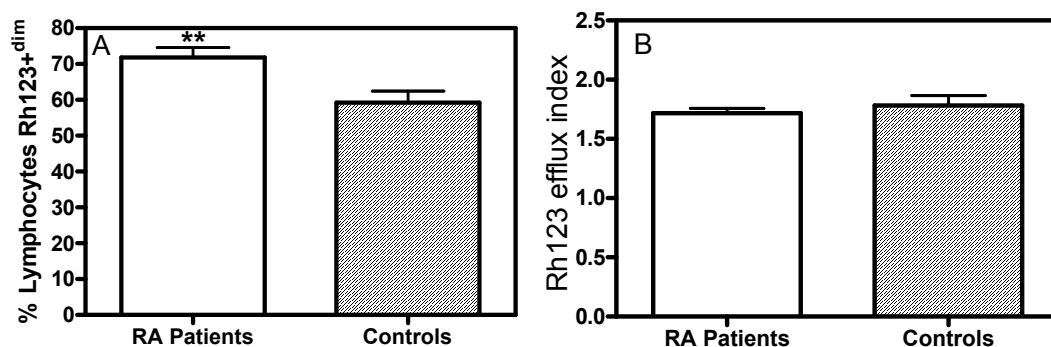
In order to address the basal drug extrusion activity of P-gp, we analyzed the percentage of lymphocytes extruding Rh123. Representative flow cytometry data are shown in Fig. 5. Lymphocytes were gated and separated into two distinct cell populations based on the ability to extrude Rh123: (a) Rh123<sup>dim+</sup> cells that are actively extruding Rh123 and (b) Rh123<sup>bright+</sup> cells that are not extruding the stain. The region of Rh123<sup>bright+</sup> cells was defined by cultures treated with verapamil that blocks P-gp extrusion and increase fluorescence (Fig. 5D).

Interestingly, RA patients ( $71.81\% \pm 2.79$ ) had a significantly higher percentage of Rh123<sup>dim+</sup> lymphocytes than controls ( $59.22\% \pm 3.31$ ),  $t = 2.73$ ,  $p = 0.008$  (Fig. 6A). In line with this observation, lymphocytes of patients had a significantly lower mean fluorescence intensity of Rh123 compared to controls,  $202.64 \pm 12.04$  vs.  $300.50 \pm 20.02$  respectively,  $t = 4.41$ ,  $p = 0.0001$ .

Furthermore, DEX non-responders patients had a higher percentage of Rh123<sup>dim+</sup> lymphocytes compared to DEX responders,  $75.78\% \pm 3.37$  vs.  $66.53\% \pm 4.56$  respectively,  $t = 1.67$ ,  $p = 0.10$ . In contrast, we found no significant differences in the P-gp activity between patients and controls,  $p = 0.43$  (Fig. 6B). In addition, there were no age-related effects in P-gp activity.



**Fig. 5.** Representative flow cytometry analysis of P-gp function. (A) Shows the cellular gates. The P-gp activity was evaluated in the lymphocyte gate. (B) Dot plot of cells incubated with Rh123 in healthy control. (C) Dot plot of cells incubated with Rh123 in RA patient. (D) Lymphocyte incubated with Rh123 and the verapamil in control. (E) Histogram shows the overlap of lymphocyte incubated with Rh123 in the absence or presence of verapamil.



**Fig. 6.** Analysis of P-gp activity. (A) Percentage of Rh123<sup>dim</sup> lymphocytes. (B) P-gp activity shown as efflux index of Rh123. Statistically significant differences are shown, \*\*p < 0.01.

#### 7.4. Genetic polymorphisms of the *ABCB1* drug transporter

To investigate the possible relation of the genetic *ABCB1* polymorphisms with functional P-gp activity, we evaluated the frequencies of the polymorphisms in three exons *ABCB1* gene in RA patients and controls (Table 3). We found no significant differences in the frequencies of the exon 12 ( $\chi^2 = 1.83$ ,  $p = 0.40$ ) and exon 26 ( $\chi^2 = 3.92$ ,  $p = 0.14$ ) between RA patients and controls, independently of age. RA patients and controls with different *ABCB1* genotypes showed similar activity of P-gp (data not shown). There were no associations between *ABCB1* polymorphisms and clinical features including rheumatoid factor, morning stiffness, duration of disease and use of medication.

**Table 3.** Frequencies of the *ABCB1* polymorphisms

|                                 | RA patients   | Controls     |
|---------------------------------|---------------|--------------|
| <i>ABCB1</i> C1236T (exon 12)   |               |              |
| CC                              | 7/34 (20.6%)  | 1/6 (16.7%)  |
| CT                              | 19/34 (55.9%) | 2/6 (33.3%)  |
| TT                              | 8/34 (23.5%)  | 3/6 (50%)    |
| <i>ABCB1</i> G2677T/A (exon 21) |               |              |
| GG-AA                           | 6/40 (15%)    | -            |
| G-AT                            | 27/40 (67.5%) | -            |
| TT                              | 7/40 (17.5%)  | -            |
| <i>ABCB1</i> C3435T (exon 26)   |               |              |
| CC                              | 6/46 (13%)    | 5/14 (35.7%) |
| CT                              | 26/46 (56.5%) | 5/14 (35.7%) |
| TT                              | 14/46 (30.4%) | 4/14 (28.6%) |

### 7.5. Clinical correlates of P-gp activity

Here, we investigated the possible association of P-gp with clinical characteristics of RA patients. We found no significant correlation ( $r = -0.094$ ,  $p = 0.53$ ) between the P-gp efflux and age of patients. P-gp activity was not correlated to clinical markers or sensitivity to GCs.

## 8. Discussion

The treatment of RA includes anti-inflammatory drugs, immunosuppressors, anti-malarics and cytokine inhibitors [3]. Of special note, the GCs have been commonly used as powerful drugs for the treatment of inflammatory diseases, neoplasias and transplants [4, 5]. However, chronic GC treatment is frequently associated with acquired steroid resistance [6, 7]. Indeed, there is some data suggesting that RA patients may develop GC resistance [6, 7]. Steroid resistance could be influenced by several factors including age, severity of disease and genetic polymorphisms of the GC receptor and/or P-gp. In this study, we inves-



tigated the impact of age on lymphocyte sensitivity to steroids and the potential involvement of steroid resistance with *ABCB1* polymorphisms and function.

Spontaneous and mitogen-induced proliferation/viability of T-cells were found significantly increased in patients compared to controls. This could be explained by the chronic inflammatory condition in RA characterized by lymphocyte infiltration and tissue damage [1]. Local immunoregulation in the joints is disturbed, producing dysregulated systemic proliferation and/or increasing viability by selecting cells less susceptible to apoptosis [25, 26]. Previous data are conflicting in RA. Some investigators observed no changes in cell proliferation [27] and others reported increased proliferative responses [28]. These discrepancies could be due to differences in clinical features of RA patients such as treatments, severity and/or duration of the disease.

There is some data suggesting that RA patients develop acquired GC resistance, requiring greater drug amounts and/or extended period of treatment [6, 7]. However, there is considerable debate over this finding since others have found cells with increased sensitivity to steroids in RA [8]. These discrepancies could be due to disease-modifying factors including age, severity of disease and genetic background [9]. In this study, we investigated peripheral T-cell sensitivity to GCs that are differentially mobilized by P-gp: DEX (synthetic GC that is extruded by P-gp) and CORT (natural hormone that is not extruded by P-gp). Accordingly to previous studies [11, 27], we observed that cells of patients and controls responded similarly to both compounds *in vitro*. Based on previous work suggesting that steroid sensitivity maybe tissue-specific [29], we speculate that non-activated peripheral lymphocytes are fully responsive to steroids compared to synovial lymphocytes. We have previously observed that peripheral T-cell subsets (CD4 and CD8) of RA patients are essentially inactive, as judged by the capacity to express early activation markers CD25

and CD69 (unpublished data). The chronic local (joint) inflammation may be important in modulating steroid responsiveness *in vivo*. For instance, there is some evidence suggesting that pro-inflammatory cytokines may change cellular sensitivity to GCs [30, 31]. In future studies, it would be thus interesting to compare cellular sensitivity to GCs between synovial tissue and peripheral blood. Nevertheless, it is remarkable that cells of RA patients under a mixed drug regimen (steroidal and non-steroidal) are still fully responsive to GCs *in vitro*. Additionally, we observed some age-related effects for steroid sensitivity. In particular, non-stimulated PBMCs of middle-aged patients were found more sensitive to DEX. It is tempting to speculate that this age group will benefit from steroidal treatments.

To date, it is unknown to what extent the steroid resistance is associated with resistance to other drugs. One important mode of drug resistance can be due to enhanced cellular extrusion of drugs, a process that can be mediated by specific members of a superfamily of ATP-binding cassette (ABC) proteins [32]. Since these proteins can mediate the efflux of a wide range of structurally unrelated drugs, they are also referred to as MDR proteins [33]. Normal peripheral blood lymphocytes (but not macrophages) express P-gp and show significant efflux of the P-gp substrates doxorubicin and rhodamine 123 [34, 35]. Since lymphocytes are not involved in detoxification or hormone secretion, the physiological role of P-gp in these cells are still obscure. It has been shown that P-gp may be involved in the transport of cytotoxic substrates that play a role in cellular immune mechanisms such as NK function [36], CD8<sup>+</sup> mediated cytotoxicity [37, 38] and TNF- $\alpha$  secretion [36, 39].

In this study, we observed an increased basal percentage of Rh123<sup>dim</sup> lymphocytes in patients than in controls in spite of similar functional P-gp activity. In order to explain this apparent contradiction, we speculate that cells of patients would display a higher number of P-gp molecules and, consequently, extruded more Rh123. Based on our data, cells of

RA patients are likely to over express ~12.6% more P-gp molecules than cells of controls. To confirm the existence of MDR in RA, further studies are required to evaluate both the cell-surface density of P-gp molecules as well as functional activity. These data is in contrast with previous work reporting increased P-gp activity in PBMCs from RA patients with active disease [15]. Enhanced P-gp activity was associated with unfavorable clinical course and a poor response to treatment. This discrepancy could be due to differences in the methodology used to evaluate P-gp activity. In this study, we used a common P-gp antagonist that enabled us to directly measure P-gp activity by inhibiting extrusion of Rh123. Previous work that evaluated the cellular efflux of daunorubicin without P-gp antagonist should be taken with caution [15]. Additional studies relating to substrate specificity, regulation and function of P-gp are needed.

The pharmacodynamics is influenced by individual's genetic background. Some genetic polymorphisms of the *ABCB1* gene have been described and are associated with disposition of P-gp substrates in humans [16, 17]. Here, we investigated the association of the *ABCB1* gene polymorphisms in RA and the expression and function of P-gp. It was observed a similar distribution of C3435T *ABCB1* genotypes between RA patients and healthy controls. Previous data have suggested that C3435T *ABCB1* polymorphism is not an important genetic risk factor for RA susceptibility, but it might influence the disease activity as well as playing a role in patients who are refractory to drug treatment [15, 40, 41]. It was also demonstrated that the probability of remission of RA symptoms was greater in patients with the 3435TT genotype compared to patients with the genotypes 3435CC and 3435CT [40]. In this study, *ABCB1* polymorphisms were not associated to P-gp function. This is in contrast to previous study that associated the C3435T polymorphism with decreased P-gp function in NK lymphocytes [42]. Further studies should include a

larger sample size to better address the associations of *ABCB1* polymorphisms with RA susceptibility and clinical course. Pharmacogenetic testing achieves an increasing impact in the individualization of drug treatment and could therefore contribute significantly to enhanced drug safety and efficacy [43].

In summary, we demonstrated here that PBMCs of RA patients under multiple drug treatments are fully responsive to GCs *in vitro* and present higher extrusion of drugs by peripheral lymphocytes in spite of normal P-gp function. More studies comparing the synovial tissue with PBMCs are necessary to better understand general responsiveness to GCs. In addition, it would be valuable to compare sensitivity to GCs and P-gp function between patients with active and inactive, well-controlled disease.

## 9. Acknowledgments

This study was supported by grants from CNPq (551180/01-3, M.E.B.).

## 10. References

1. MF Doran, GR Pond, CS Crowson, WM O'Fallon, SE Gabriel. Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, over a forty-year period. *Arthritis Rheum* 2002; 46(3):625-31.
2. M Feldmann, FM Brennan, RN Maini. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996; 85(3):307-10.
3. JS Smolen, D Aletaha, KP Machold. Therapeutic strategies in early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005; 19(1):163-77.
4. Y Wan, SK Nordeen. Identification of genes differentially regulated by glucocorticoids and progestins using a Cre/loxP-mediated retroviral promoter-trapping strategy. *J Mol Endocrinol* 2002; 28(3):177-92.
5. H Schacke, WD Docke, K Asadullah. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 2002; 96(1):23-43.
6. K Onda, E Rimbara, T Hirano *et al.* Role of mRNA expression of transcription factors in glucocorticoid sensitivity of peripheral blood mononuclear cells and disease state in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004; 31(3):464-9.

7. A De, HM Blotta, RL Mamoni, P Louzada, MB Bertolo, NT Foss, AC Moreira, M Castro. Effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation and cytokine production in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29(1):46-51.
8. CJ Heijnen, A Kavelaars. The importance of being receptive. *J Neuroimmunol* 1999; 100(1-2):197-202.
9. I del Rincon, DH O'Leary, RW Haas, A Escalante. Effect of glucocorticoids on the arteries in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(12):3813-22.
10. C Luz, F Dornelles, E Scapini, D Collaziol, T Preissler, I Cruz, ME Bauer. Psychological and nutritional correlates of T-cell function in the healthy elderly. *Stress* 2002; 5:80-.
11. T Hirano, N Tsuboi, M Homma *et al.* Comparative study of lymphocyte-suppressive potency between prednisolone and methylprednisolone in rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology* 2000; 49(3):411-7.
12. N Rohleder, JM Wolf, C Kirschbaum. Glucocorticoid sensitivity in humans-interindividual differences and acute stress effects. *Stress* 2003; 6(3):207-22.
13. W van de Vrie, RL Marquet, G Stoter, EA De Bruijn, AM Eggermont. In vivo model systems in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1998; 35(1):1-57.
14. A Diaz-Borjon, Y Richaud-Patin, C Alvarado de la Barrera, J Jakez-Ocampo, A Ruiz-Arguelles, L Llorente. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part II: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients might affect steroid requirements for disease control. *Joint Bone Spine* 2000; 67(1):40-8.
15. L Llorente, Y Richaud-Patin, A Diaz-Borjon, C Alvarado de la Barrera, J Jakez-Ocampo, H de la Fuente, R Gonzalez-Amaro, E Diaz-Jouanen. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part I: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients might influence disease outcome. *Joint Bone Spine* 2000; 67(1):30-9.
16. LA Mickley, JS Lee, Z Weng, Z Zhan, M Alvarez, W Wilson, SE Bates, T Fojo. Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. *Blood* 1998; 91(5):1749-56.
17. S Hoffmeyer, O Burk, O von Richter *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7):3473-8.
18. FC Arnett, SM Edworthy, DA Bloch *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31(3):315-24.
19. D Collaziol, T Preissler, ME Bauer. Avaliação da proliferação linfocitária e sensibilidade a glicocorticóides por ensaios colorimétricos. *Revista de Medicina da PUCRS* 2002; 12:226-31.
20. T Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
21. JP Marie, S Huet, AM Faussat *et al.* Multicentric evaluation of the MDR phenotype in leukemia. French Network of the Drug Resistance Intergroup, and Drug Resistance Network of Assistance Publique-Hopitaux de Paris. *Leukemia* 1997; 11(7):1086-94.

22. DK Lahiri, JI Nurnberger, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(19):5444.
23. I Cascorbi, T Gerloff, A Johne *et al.* Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69(3):169-74.
24. RL Roberts, PR Joyce, RT Mulder, EJ Begg, MA Kennedy. A common P-glycoprotein polymorphism is associated with nortriptyline-induced postural hypotension in patients treated for major depression. *Pharmacogenomics J* 2002; 2(3):191-6.
25. E Taranto, M Leech. Expression and function of cell cycle proteins in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Histol Histopathol* 2006; 21(2):205-11.
26. JD Mountz, J Wu, J Cheng, T Zhou. Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37(10):1415-20.
27. R Schlaghecke, D Beuscher, E Kornely, C Specker. Effects of glucocorticoids in rheumatoid arthritis. Diminished glucocorticoid receptors do not result in glucocorticoid resistance. *Arthritis Rheum* 1994; 37(8):1127-31.
28. JS Percy, P Davis, AS Russell, E Brisson. A longitudinal study of in vitro tests for lymphocyte function in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1978; 37(5):416-20.
29. IC Chikanza, D Kozaci, Y Chernajovsky. The molecular and cellular basis of corticosteroid resistance. *J Endocrinol* 2003; 179(3):301-10.
30. JC Kam, SJ Szeffler, W Surs, ER Sher, DY Leung. Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J Immunol* 1993; 151(7):3460-6.
31. CM Pariente, BD Pearce, TL Pisell, CI Sanchez, C Po, C Su, AH Miller. The proinflammatory cytokine, interleukin-1alpha, reduces glucocorticoid receptor translocation and function. *Endocrinology* 1999; 140(9):4359-66.
32. P Borst, RO Elferink. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2002; 71:537-92.
33. R Oerlemans, J van der Heijden, J Vink *et al.* Acquired resistance to chloroquine in human CEM T cells is mediated by multidrug resistance-associated protein 1 and provokes high levels of cross-resistance to glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 2006; 54(2):557-68.
34. WT Klimecki, BW Futscher, TM Grogan, WS Dalton. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* 1994; 83(9):2451-8.
35. D Drach, S Zhao, J Drach, R Mahadevia, C Gattringer, H Huber, M Andreeff. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. *Blood* 1992; 80(11):2729-34.
36. WT Klimecki, CW Taylor, WS Dalton. Inhibition of cell-mediated cytotoxicity and P-glycoprotein function in natural killer cells by verapamil isomers and cyclosporine A analogs. *J Clin Immunol* 1995; 15(3):152-8.
37. S Gupta, S Gollapudi. P-glycoprotein (MDR 1 gene product) in cells of the immune system: its possible physiologic role and alteration in aging and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. *J Clin Immunol* 1993; 13(5):289-301.
38. S Gupta, CH Kim, T Tsuruo, S Gollapudi. Preferential expression and activity of multidrug resistance gene 1 product (P-glycoprotein), a functionally active efflux pump, in human CD8+ T cells: a role in cytotoxic effector function. *J Clin Immunol* 1992; 12(6):451-8.

39. SE Salmon, WS Dalton. Relevance of multidrug resistance to rheumatoid arthritis: development of a new therapeutic hypothesis. *J Rheumatol Suppl* 1996; 44:97-101.
40. A Pawlik, J Wrzesniewska, I Fiedorowicz-Fabrycy, B Gawronska-Szklarz. The MDR1 3435 polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42(9):496-503.
41. RJ Farrell, A Murphy, A Long *et al.* High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology* 2000; 118(2):279-88.
42. M Hitzl, S Drescher, H van der Kuip, E Schaffeler, J Fischer, M Schwab, M Eichelbaum, MF Fromm. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001; 11(4):293-8.
43. DR Pfof, MT Boyce-Jacino, DM Grant. A SNPshot: pharmacogenetics and the future of drug therapy. *Trends Biotechnol* 2000; 18(8):334-8.

## 11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, avaliamos o impacto da idade na sensibilidade linfocitária aos GCs e o possível envolvimento da resistência esteroideal com polimorfismos *ABCB1* e a atividade funcional da P-gp.

Encontramos que a proliferação espontânea ou induzida por mitógeno de células T estava mais elevada nos pacientes com AR, sendo possivelmente relacionada à inflamação crônica que é caracterizada pela infiltração de linfócitos no líquido sinovial, causando danos aos ossos e cartilagens e eventualmente conduzindo à destruição das articulações.

Alguns estudos sugerem o desenvolvimento de uma resistência adquirida aos GCs em pacientes com AR, mostrando que os pacientes necessitam de altas dosagens dos medicamentos por longos períodos de tratamento. Porém, neste estudo, não encontramos diferença na sensibilidade periférica aos GCs entre pacientes e controles. Seria interessante, portanto, comparar a sensibilidade aos GCs em linfócitos do líquido sinovial bem como nas células periféricas. Todos os pacientes do nosso estudo eram medicados e isto pode ter sido uma variável de influência nos resultados. Desta forma, considero importante analisar um grupo de pacientes livre de quaisquer medicamentos. Embora isso seja extremamente difícil na realidade.

Além do papel farmacológico dos transportadores MDR na expulsão celular de compostos tóxicos e drogas, há evidências que os transportadores MDR podem exercer um importante papel fisiológico nos processos imunológicos. A função fisiológica de muitos destes transportadores ABC e seu possível papel na resistência a drogas permanece por ser elucidado. Nós observamos atividades semelhantes da P-gp entre pacientes e controles,



enquanto outros estudos sugerem uma atividade aumentada da P-gp e o seu envolvimento com a pobre resposta ao tratamento. Mais estudos são necessários para avaliar a regulação e função da P-gp linfocitária. Seria necessário um maior número de pacientes para verificar as associações dos polimorfismos *ABCB1* com a resposta clínica e susceptibilidade à AR, podendo dessa forma determinar a individualização do tratamento.