

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**POLIMORFISMOS MOLECULARES DO GENE *MDR1/ABCB1*
EM PACIENTES COM LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Tatiana Pereira Gonzalez

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies
Co-orientadora: Prof. Dra. Marion Schiengold**

**Porto Alegre
Março 2006**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de imunogenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Instituições financiadoras:

CNPq

FAPERGS

Agradecimentos

Aos meus pais.

Muita gente sabe o que é conviver com um pós graduando em casa. Minha mãe sabe o que é conviver com dois. Obrigada, mãe, por primeiro ter me incentivado a me tornar bióloga; obrigada, pai, por dividir comigo toda a tua (e a minha) aventura pelos caminhos da pesquisa. Valeu todos os puxões de orelha, a compreensão, o carinho e o incentivo. Obrigada por me darem apoio sempre e me ajudarem a manter os pés no chão e a cabeça no lugar. Obrigada por tudo.

Ao Imunopovo. Há cinco anos faço parte de um laboratório que parece coração de mãe:

sempre cabe mais um.

É um enorme prazer ter amigos e colegas como

a Mel, sempre motivada, o Pedro, sempre tão tranqüilo, a Cida, sempre cheia de paciência, a Ale Bruno, sempre de bom humor, a Flá, sempre cheia de entusiasmo, e o Andrés, sempre um cientista.

Gente como a Paula, parceira de dançar de pés descalços em todos os bailes da biologia, a Déia Wieck, parceira de indiadas e de artigos na *Pathetical Hypotheses*, a Déia Vargas, parceira de Hello Kittys e “almoços-na-lancheira” e a Lú, parceira em super-seminários. Muito obrigada aos amigos e colegas Pítia, Rê (valeu a força na estatística!), Pri, Tiago D., Dani G., Lê, Andrei, Lindolfo, Simone, Raquel, Ane, Jú, D. Dilma, Profs. Guido e Kátia, e a todos que colaboram com nosso laboratório, inclusive os “anexos” Rico, “Ponc” e Adri. Obrigada, Luana e Leo, “meus” estagiários, por aceitarem meus erros e manias sempre de bom humor. **À todos os professores do departamento**, por tudo que me ensinaram em sala de aula e fora dela. Agradeço à Nance Nardi, cujo conselho, anos atrás, de entrar para um coral a fim de falar mais alto e devagar, eu ainda não esqueci, e ao Renato Flores, responsável por muitos dos mapas mentais que atormentam a minha lógica e razão nos últimos anos.

Aos colegas geneticistas Vê, Fabi, Júlia, Andréa Marrero, Ernesto, obrigada pela amizade e companheirismo. Agradeço à Sílvia, (as fotos ficaram bem boas sim!), e à Marilú (valeu toda a ajuda e “controles positivos”) que sempre me receberam tão bem mesmo quando eu já achava que estava “pedindo demais”. **Ao Elmo**, secretário do Pós, sempre amigo incondicional de todos, com suas disposição e entusiasmo de ferro, com as quais é impossível não se contagiar.

pela amizade, carinho e por estarem comigo nos
Às Gralhas Geneticistas, Jana e me ouvirem, me aconselharem resgatarem das, digamos,



As gralhas, Ane, Ana, Cris e Jana, obrigada estímulo. Obrigada por me levarem pra festa momentos mais peculiarmente divertidos.

Ana, obrigada pela companhia, por sempre e me darem apoio. Obrigada também por me “enrascadas” que vocês mesmo me metem...

À Patrícia (“Patisha”), agradeço por ser como uma irmã. Acho que o “um ano” de distância nos fez aprender muito sobre nós mesmas e sobre a vida, mas saber que uma verdadeira amizade nunca morre e suporta até mesmo as dores da sinceridade, me faz aprender todo dia que, de fato, “o melhor espelho é um velho amigo”. Não só o melhor espelho, mas fonte de apoio, de críticas, de conselhos, de inspiração...





Ao Gustavo (Fioravanti), cuja amizade começou junto com o mestrado e, como este, teve altos e baixos. Obrigada por estar sempre por perto, por aparecer do nada quando eu menos esperava, me acompanhar em “furadas”, me dizer a verdade sem enfeites, brigar comigo, mas ainda assim sempre ter algo pra dizer que me fizesse sorrir.

Ao Dani (Oberdoerfer), muito obrigada por todo o “grande e muito” apoio que sempre me deu, toda a confiança que me tem e todas as vezes em que somente falar com ele deixa o mundo mais bonito - telefone, celular, torpedão, MSN, Orkut, Fotolog, vale tudo. Não sei quando, nem como, mas sei que hoje o Dani é um dos meus melhores amigos e uma fonte interminável de alegria. **Ao Tiago** (Veit),



que é possível saber e conseguir o que se quer e se orgulhar no fim, pelos almoços no RU e por ter se tornado um grande amigo e “farmacêutico de plantão” em todos os (vários) momentos em que este projeto exigiu um. Por fim, seguindo o método científico, cito as minhas referências bibliográficas. Talvez não exatamente bibliográficas, mas de fato científicas.

Ao Zéca, José Artur Bogo Chies, agradeço por ser exigente o suficiente pra me manter “dentro dos protocolos” mas também amigo o suficiente pra me convencer a jogar vôlei quando nenhum professor em oito anos de colégio conseguiu me manter mais do que dois minutos em quadra. Agradeço por ser uma fonte fantástica de biologia molecular (melhor que o



Maniatis – talvez não tão completa, mas definitivamente mais fácil de consultar!). Agradeço pela oportunidade, pela

confiança e por tudo que me ensinastou.

À Marionzinha, Marion Schiengold, agradeço por ter me iniciado no “Maravilhoso Mundo da Genética”, por rir, sonhar alto e voltar à Terra comigo, por apostar em mim. Agradeço por me mostrar, trilhar e concluir comigo o caminho que me trouxe até aqui.



Um caminho que me permitiu conhecer muitas e aprender com todas as pessoas maravilhosas que citei

e que tem como resultado esta dissertação.

| | |
|---|----|
| Abreviaturas | 06 |
| Resumo | 07 |
| Abstract | 08 |
| Introdução | 09 |
| Objetivos | 29 |
| <i>ABCBI</i> C1236T, G2677T/A and C3435T polymorphisms in systemic lupus erythematosus | 30 |
| Discussão | 50 |
| Referências Bibliográficas | 55 |
| Anexo: Detalhamento dos Métodos | 65 |

ABREVIATURAS

ABC – *ATP-binding cassette* (sítio de ligação a ATP)

ATP – *Adenosine tri-phosphate* (Adenosina trifosfato)

AUC - *area under the plasma concentration-time curve* (área abaixo da curva de concentração-tempo no plasma)

cDNA – *coding DNA* (DNA codificante)

EBV – *Epstein-Barr vírus* (vírus Epstein-Barr)

FACS – *fluorescence activated cell sorter* (citometria de fluxo)

HIV – *human immunodeficiency vírus* (vírus da imunodeficiência humano)

MAb – *monoclonal antibody* (anticorpo monoclonal)

MDR – *multidrug resistance* (resistência a múltiplas drogas)

MHC – *major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)

mRNA – *messenger RNA* (RNA mensageiro)

NK – *natural killer*

OMIM – *online mendelian inheritance in man*

PCR – *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

Pgp – *P-glycoprotein* (glicoproteína P)

RFLP – *restriction fragment length polymorphism* (polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição)

SD – *standard deviation* (desvio padrão)

SLE – *systemic lupus erythematosus* (lupus eritematoso sistêmico)

SNP – *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)

UTR – *untranslated region* (região não traduzida)

A Glicoproteína P (Pgp), produto do gene *MDR1* (*ABCB1*), é um transportador de efluxo que age sobre uma grande variedade de substratos e constitui um mecanismo de proteção do organismo contra xenobióticos. O gene *MDR1* apresenta um grande número de polimorfismos e um número cada vez maior de estudos mostra que alguns destes podem afetar a expressão e atividade da Pgp, além de apresentarem implicações no desenvolvimento e susceptibilidade a algumas doenças e também na resposta a tratamento farmacológico. No entanto, ainda existem controvérsias. A Pgp tem sido estudada em algumas doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico (SLE), onde foi detectado aumento de atividade deste transportador. Neste trabalho, os polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T foram analisados em uma amostra de Brasileiros de origem Européia e em uma amostra de pacientes com SLE. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre as duas amostras quanto às distribuições alélicas e genótípicas destes polimorfismos. Foi observada uma maior frequência do alelo 3435C em pacientes afrodescendentes em relação aos eurodescendentes. A análise de características clínicas mostrou que (1) pacientes com eritema malar apresentaram menor frequência do alelo 2677A em comparação com pacientes sem eritema malar; e (2) pacientes com pleurite apresentam maior frequência do alelo 2677A e do genótipo 2677TA em comparação com aqueles sem pleurite. Estes dados indicam um possível envolvimento destes polimorfismos na resposta imunológica, especialmente do alelo 2677A, uma vez que eritema malar e pleurite envolvem respostas imunológicas contrastantes, respectivamente, tipos Th2 e Th1.

ABSTRACT

P-glycoprotein (Pgp), the *MDR1* (*ABCB1*) gene product, is an efflux pump that transports a huge variety of substrates and is a mechanism of xenobiotic protection. *MDR1* gene presents a great number of polymorphisms and an increasing number of studies show that some of those may affect Pgp expression and activity, besides affecting the development and susceptibility of diseases and pharmacological response. However, there are still controversies. Pgp has been studied in some autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE), where high activity of this transporter was detected. In the present work, C1236T, G2677T/A, and C3435T polymorphisms were analyzed in a sample of Brazilian individuals with European ancestry and in a sample of SLE patients. No statistically significant differences were detected between these samples concerning allelic or genotypic frequencies of these polymorphisms. It was observed a higher frequency of the 3435T allele in patients with African ancestry than in patients with European ancestry. Clinical characteristics analysis showed that (1) patients developing malar rash presented lower frequency of the 2677A allele than patients without malar rash; and (2) patients with pleuritis presented higher frequency of the 2677A allele and 2677TA genotype in comparison with those without pleuritis. These data indicate possible involvement of these polymorphisms in immunological response, specially the 2677A allele, as rash malar and pleuritis are consequence of contrasting immune responses, respectively, Th2 and Th1 types.

A resistência a múltiplas drogas (MDR) foi primeiramente observada em cânceres humanos. A quimioterapia é o principal tratamento para cânceres sistêmicos, os quais não podem ser curados por cirurgia ou radioterapia. Embora possa ser eficaz em alguns casos, a maior parte dos cânceres metastáticos se apresenta resistente à quimioterapia ou, embora responda ao tratamento inicialmente, retorna como um câncer que adquiriu resistência. Esse fenômeno recebeu o nome de *resistência a múltiplas drogas*, por abranger um amplo espectro de agentes citotóxicos, e foi descrito na década de 1960 (Kessel *et al.*, 1965, 1968). Nos trabalhos iniciais, foi observado que células que apresentavam o fenótipo de resistência a múltiplas drogas apresentavam também um aumento na expressão da glicoproteína P (Pgp, onde P significa permeabilidade).

A glicoproteína P pertence à subfamília ABCB da superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), que compreende proteínas que transportam uma ampla variedade de substratos, tais como açúcares, aminoácidos, peptídeos, íons inorgânicos, além de diversos compostos hidrofóbicos e metabólitos (revisão em Dean *et al.*, 2001a e Dean *et al.*, 2001b). Uma das características primeiramente observadas no fenótipo MDR de células cancerosas é a resistência cruzada a drogas que não apresentam relação estrutural ou de função. Diversos estudos mostraram que a Pgp age sobre uma grande quantidade de substratos que apresentam como característica comum apenas o fato de serem, em geral, lipofílicos e anfipáticos (revisão em Schwab *et al.*, 2003a e Marzolini *et al.*, 2004). O Quadro 1 lista substratos descritos para Pgp.

| Quadro 1. Substratos da Pgp | | | |
|--|--|--|--|
| Antiarrítmicos Digoxina Verapamil | Antidepressivos Amitriptilina | Anti-histamínicos Cimetidina Fexofenadina Ranitidina Terfenadina | Esteróides Aldosterona Cortisol Dexametasona Estradiol Hidrocortisona Metilprednisolona |
| Antibióticos Eritromicina Esparfloxacina Levofloxacina Tetraciclina | Antidiarréicos Loperamida | Anti-maláricos Halofantrina Mefloquina | Outros Colchicina Debrisoquina Ivermectina Morfina Rodamina 123 Triton X-100 Vecurônio |
| Anticancerígenos Actinomicina D Daunorubicina Docetaxel Doxorubicina Etoposide Irinotecan Mitomicina C Mitoxantrona Paclitaxel Teniposida Topotecan Vinblastina Vincristina Vindesina | Antiepilépticos Carbamazepina Felbamato Fenobarbital Fenitoína Gabapentina Lamotrigina Lamotrigina Topiramato | Anti-micóticos Itraconazol | Redutores do nível de lipídios Atorvastatina Lovastatina |
| | Anti-hipertensivos Bunitrolol Celiprolol Diltiazem Losartan Mibefradil Nicardipina Talinolol | Anti-virais Amprenavir Indinavir Nelfinavir Ritonavir Saquinavir | |
| | | Imunossupressores Ciclosporina A Rapamicina Tacrolimus | |

Lista baseada em artigos de revisão (Marzolini *et al.*, 2004; Sakaeda *et al.*, 2004; Schwab *et al.*, 2003a; Sakaeda *et al.*, 2002).

São conhecidas várias isoformas da glicoproteína P, classificadas em classe I, II e III. As classes I e II estão relacionadas com a resistência a múltiplas drogas, enquanto a classe III está envolvida no transporte de fosfolipídios (van Helvoort *et al.*, 1996; Dey, 2006). Camundongos, ratos e hamsters apresentam as três classes. Em humanos são descritas duas isoformas, *MDR1* (classe I) e *MDR3* (classe III), codificadas, respectivamente, pelos genes *ABCB1* e *ABCB4* (Gottesman & Pastan, 1993). Há uma alta identidade de seqüência entre as isoformas humanas, a despeito das diferenças na função de transporte que apresentam, e mesmo entre genes MDR humanos e murinos é observada uma alta homologia. O gene *ABCB1* (NT_007933; NM_000927), que é também chamado

de *MDR1*, está localizado em 7q21.1 (Callen *et al.*, 1987) e é constituído por uma região promotora e 29 éxons, totalizando 209kb (Bodor *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 1990).

A subfamília ABCB inclui, além da Pgp, transportadores TAP (genes *ABCB2* e *ABCB3*), que atuam no transporte de peptídeos no retículo endoplasmático, transportadores envolvidos na secreção da bile no fígado, e transportadores que atuam no metabolismo do ferro na mitocôndria (revisão em Dean *et al.*, 2001b). A superfamília de transportadores ABC, no entanto, inclui outras proteínas envolvidas na resistência a múltiplas drogas. O transportador BCRP (*breast cancer resistance protein*, gene *ABCG2*) apresenta capacidade de conferir fenótipo MDR a células cancerosas *in vitro* (revisão em Gottesman *et al.*, 2002). Há evidências de que as proteínas MRP (*multidrug resistance-associated protein*, genes *ABCC1-6*, revisão em Kruh & Belinsky, 2003) apresentem sobreposição de funções com a Pgp, tanto pelos substratos sobre os quais agem como pelos tecidos onde são detectadas (revisão em Leslie *et al.*, 2005). *MRP1* é também capaz de conferir resistência a múltiplas drogas *in vitro* (revisão em Gottesman *et al.*, 2002).

A estrutura da Pgp, representada esquematicamente na Figura 1, consiste de duas metades homólogas constituídas por um domínio transmembrana com seis segmentos hidrofóbicos e um domínio citoplasmático com um sítio de ligação para ATP, totalizando 1280 aminoácidos e 170 kDa (Juliano & Ling, 1976). São conhecidos pelo menos dois eventos pós-transcricionais para a Pgp, sendo estes glicosilação e fosforilação (Gottesmann *et al.*, 1995). Rosenberg *et al.* (1997) analisaram proteínas isoladas de células de ovário de hamster, sugerindo que a Pgp se assemelha a um cilindro com cerca de 10 nm de diâmetro e até 8 nm de altura com um poro central de 5 nm e atua como uma bomba de efluxo de drogas dependente de energia (Endicott & Ling, 1989; Ambudkar *et al.*, 1992 e Shustik *et al.*, 1995).

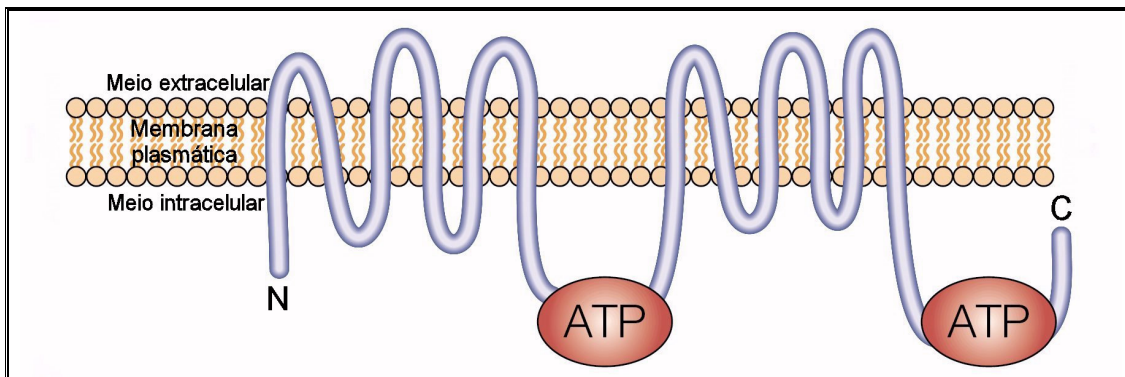


Figura 1. Representação esquemática da estrutura da Pgp, mostrando os seis segmentos transmembrana e o sítio de ligação de ATP de cada metade. N = amino-terminal, C = carboxi-terminal. Adaptado de Gottesman *et al.*, 2002.

Embora tenha sido inicialmente detectada em células tumorais, a Pgp é também expressa em células de tecidos normais. No trato gastrointestinal, a primeira barreira de defesa do corpo contra a exposição oral a drogas e toxinas, a Pgp apresenta um gradiente de expressão e está presente na membrana apical do epitélio (Thörn *et al.*, 2005; Thiebaut *et al.*, 1987). Hepatócitos apresentam Pgp na superfície canalicular apical e se propõe que façam a excreção para a bile de xenobióticos que não tenham sido eliminados no intestino (Leslie *et al.*, 2005). Nos rins, a Pgp é encontrada na superfície apical das células epiteliais dos túbulos proximais, onde medeia a exportação de xenobióticos do sangue para a urina (Leslie *et al.*, 2005; Thiebaut *et al.*, 1987). A atividade da Pgp no fígado e nos rins estaria relacionada à eliminação de drogas (Kusuhara *et al.*, 1998), enquanto no intestino, reduziria a absorção das mesmas (Watkins *et al.*, 1997), além de possivelmente prevenir o acúmulo de bactérias e seus produtos (Leslie *et al.*, 2005). No pulmão, a Pgp está localizada na superfície apical do epitélio dos brônquios e bronquíolos e também em macrófagos alveolares (Scheffer *et al.*, 2002). Na placenta, a Pgp é expressa em níveis relativamente altos na borda do sincitiotrofoblasto (Atkinson *et al.*, 2003). Nestes dois últimos tecidos, e também nas barreiras hemato-encefálica, hemato-cérebro-espinhal e hemato-testicular, a

Pgp atua na proteção contra xenobióticos, reduzindo a exposição da célula e tecidos a substâncias potencialmente tóxicos (Fromm, 2002).

Células do sistema imunológico também expressam Pgp e diversos dados sugerem um papel importante na resposta imunológica, apesar de ainda serem necessárias investigações mais profundas. Chaudhary *et al.* (1992) analisaram a expressão de Pgp (através de anticorpos monoclonais), constatando que há um gradiente de expressão desta proteína nas células do sistema imunológico, sendo a expressão em células $CD56^+>CD8^+>CD4^+$. Da mesma forma, Klimecki *et al.* (1994) observaram que esta proteína é mais expressa em células $CD56^+$ (NK) e $CD8^+$ (linfócitos T citotóxico) do que em células $CD4^+$ (linfócitos T auxiliar), $CD19^+$ (linfócitos B) e $CD14^+$ (monócitos), enquanto células $CD15^+$ (granulócitos) não apresentaram Pgp na superfície. Ainda no contexto imunológico, já foi demonstrado que algumas citocinas (como IL-2, IL-4 e INF- γ) são transportadas pela Pgp (Park *et al.*, 2003 e Drach *et al.*, 1996) e que células expostas à citocinas inflamatórias apresentam aumento na expressão do mRNA de *MDR1* (Bertilsson *et al.*, 2001). Além disso, Randolph *et al.* (1998) observaram que a migração de células dendríticas é inibida com a presença de inibidores da Pgp (verapamil ou anticorpos monoclonais específicos) e propuseram que a Pgp possa modular a migração destas através da regulação do transporte de citocinas (IL-1 β e/ou TNF).

Polimorfismos no gene MDR1

Variações na forma como diferentes indivíduos respondem a tratamentos farmacológicos são comumente observadas e podem resultar, por exemplo, de variações genéticas em enzimas de metabolização e em proteínas de transporte de drogas. Uma vez que a Pgp é um transportador envolvido na eliminação e absorção de um amplo espectro de

drogas, variações em sua atividade ou em sua expressão podem afetar a farmacocinética dos medicamentos, reduzindo ou aumentando sua biodisponibilidade.

Uma das formas mais comumente estudadas de variação genética são os polimorfismos moleculares, especialmente os SNPs (*single nucleotide polymorphisms*, polimorfismos de um único nucleotídeo). Em 2000, Hoffmeyer *et al.* descreveram 15 SNPs para o gene *MDR1* e hoje são conhecidos pelo menos 28 SNPs neste gene (Schwab *et al.*, 2003a; Eichelbaum *et al.*, 2004; Ieiri *et al.*, 2004 e Marzolini *et al.*, 2004), listados na Tabela 1. Estes polimorfismos são encontrados tanto em éxons quanto em íntrons e diversos estudos têm sido realizados em busca das conseqüências destas mutações em relação à expressão e funcionamento da Pgp. Cabe salientar que, como há um grande número de SNPs, a freqüência dos diferentes alelos apresenta diferenças inter-populacionais.

Entre os polimorfismos descritos, três têm sido especialmente estudados, C1236T, G2677T/A e C3435T (em negrito na Tabela 1). Dos 15 polimorfismos encontrados em *MDR1* por Hoffmeyer *et al.* (2000), apenas um deles apresentou correlação com os níveis de expressão e atividade de Pgp: na posição 3435 (éxon 26) ocorrem as variantes alélicas C e T, ambas codificando o aminoácido isoleucina (Ile). Naquele trabalho, foi observado que indivíduos 3435TT apresentavam menores níveis de expressão e atividade de Pgp, em relação a indivíduos com os outros genótipos. Já os outros dois polimorfismos mais freqüentemente analisados em estudos farmacogenéticos e populacionais são aqueles que apresentaram as maiores freqüências dos alelos variantes, entre os polimorfismos encontrados em éxons, no trabalho realizado por Cascorbi *et al.* (2001). Estes autores analisaram 461 indivíduos na Alemanha. Neste trabalho, foram analisados os alelos C e T na posição 1236 (éxon 12), ambos codificando o aminoácido glicina (Gly), e os alelos G, T

e A, codificando respectivamente alanina (Ala), serina (Ser) e treonina (Thr), na posição 2677. Recentemente, Wang *et al* (2005) observaram que o alelo T na posição 3435 causa uma redução na expressão de mRNA em amostras de fígado humano, sugerindo que isto ocorra devido à um efeito deste alelo na estrutura secundária da molécula, afetando a estabilidade do mRNA. Os autores analisaram combinações genóticas dos três principais polimorfismos, C1236T, G2677T/A e C3435T, observando que apenas 3435T causa este efeito.

| Tabela 1. SNPs descritos para o gene <i>MDR1</i> . | | | |
|--|---------------------|--------------|----------------------|
| Localização | Posição | Alelos | Efeito |
| Promotor | 5' flanqueadora/-41 | A/G | - |
| Exon 1a | exon 1a/-145 | C/G | - |
| Exon 1b | exon 1b/-129 | T/C | - |
| Intron 1 | exon 2/-4 | C/T | - |
| Intron 1 | exon 2/-1 | G/A | início de tradução |
| Exon 2 | exon 2/61 | A/G | Asn21Asp |
| Intron 4 | exon 5/-35 | G/C | - |
| Intron 4 | exon 5/-25 | G/T | - |
| Exon 5 | exon 5/307 | T/C | Phe103Leu |
| Intron 6 | exon 6/+139 | C/T | - |
| Intron 6 | exon 6/+145 | C/T | - |
| Exon 7 | exon 7/548 | A/G | Asn183Ser |
| Exon 11 | exon 11/1199 | G/A | Ser100Asn |
| Exon 12 | exon 12/1236 | C/T | Silenciosa |
| Intron 12 | exon 12/+44 | C/T | - |
| Exon 13 | exon 13/1474 | C/T | Arg492Cys |
| Intron 16 | exon 17/-76 | T/A | - |
| Intron 17 | exon 17/+137 | A/G | - |
| Exon 21 | exon 21/2650 | C/T | Silenciosa |
| Exon 21 | exon 21/2677 | G/T/A | Ala893Ser/Thr |
| Exon 24 | exon 24/2956 | A/G | Met986Val |
| Exon 24 | exon 24/2995 | G/A | Ala999Thr |
| Exon 26 | exon 26/3320 | A/C | Gln1107Pro |
| Exon 26 | exon 26/3396 | C/T | Silenciosa |
| Exon 26 | exon 26/3421 | T/A | Ser1141Thr |
| Exon 26 | exon 26/3435 | C/T | Silenciosa |
| Intron 28 | exon 28/+187 | G/C | - |
| Intron 28 | exon 28/+193 | A/G | - |

A posição de cada polimorfismo foi estabelecida com a primeira base do códon de iniciação ATG sendo 1, de acordo com a seqüência do GenBank M14758. Polimorfismos localizados em introns têm suas posições determinadas como *upstream* (+) ou *downstream* (-) de um dos exons adjacentes de acordo com a organização genômica descrita por Chen *et al.* (1990). Marzolini *et al.*, 2004; Schwab *et al.*, 2003a.

Diversas amostras de populações da América do Norte, Europa, Ásia e África já foram estudadas quanto às frequências alélicas e genotípicas destes três polimorfismos. A Tabela 2 lista as frequências alélicas encontradas em amostras de estudos populacionais de diferentes regiões geográficas. Quatro dos trabalhos listados, no entanto, são estudos de casos clínicos e foram incluídos nesta tabela por representarem os únicos dados disponíveis atualmente para cada uma das populações. Fiegenbaum *et al.* (2005) e Rodrigues *et al.*

(2005) fornecem os únicos dados para populações Latino-Americanas e ambos analisaram amostras de brasileiros com hipercolesterolemia e ascendência européia; Kaya *et al.* (2005) analisaram 45 pacientes com leucemia e 17 voluntários, na Turquia; e Roberts *et al.* (2002) analisaram pacientes com depressão na Nova Zelândia.

Para o polimorfismo C3435T, que já foi estudado em populações dos três continentes do chamado “Velho Mundo” (África, Ásia e Europa), a análise dos dados apresentados na Tabela 2 mostra que africanos (e populações descendentes) apresentam frequência do alelo 3435C elevada em relação às outras populações. Já o polimorfismo G2677T/A não foi analisado em populações africanas, mas observa-se uma maior frequência do alelo 2677G em afroamericanos quando comparados a outros grupos étnicos. Embora muitos estudos não tenham analisado o alelo 2677A, populações asiáticas, principalmente japonesas, parecem apresentá-lo em uma frequência elevada comparada à apresentada por populações européias. Para o polimorfismo C1236T, um maior número de análises pode confirmar a tendência observada de maior frequência do alelo 1236T em asiáticos.

Vários dos estudos citados na Tabela 2 mostram que há evidências de desequilíbrio de ligação entre os alelos 1236C, 2677G e 3435C (Kim *et al.*, 2001; Tanabe *et al.*, 2001; Illmer *et al.*, 2002; revisão em Marzolini *et al.*, 2004). Observa-se que frequentemente mais de 60% dos indivíduos analisados, independente de sua origem, apresentam as combinações de genótipos CT-GT-CT, CC-GG-CC e TT-TT-TT nas posições 1236-2677-3435, respectivamente.

Tabela 2. Frequências alélicas dos polimorfismos dos éxons 12, 21 e 26 do gene *MDR1* em populações de diferentes regiões ou países

| População | Posição no cDNA n | 1236 | | 2677 | | | 3435 | | Referência |
|--------------------------|----------------------|---------|------|---------|-------|------|---------|------|--------------------------------|
| | | exon 12 | | exon 21 | | | exon 26 | | |
| | | C | T | G | T | A | C | T | |
| Américas | | | | | | | | | |
| Brasil§ | 99 | 0,54 | 0,46 | 0,51 | 0,49* | | 0,44 | 0,56 | Fiegenbaum <i>et al.</i> 2005 |
| Brasil§ | 69 | | | 0,58 | 0,38 | 0,04 | 0,54 | 0,46 | Rodrigues <i>et al.</i> 2005 |
| EUA (afrodescendentes) | 23 | 0,85 | 0,15 | 0,85 | 0,15 | | 0,74 | 0,26 | Kim <i>et al.</i> 2001 |
| EUA (afrodescendentes) | 41 | | | | | | 0,78 | 0,22 | Schaeffeler <i>et al.</i> 2001 |
| EUA (afrodescendentes) | 88 | | | | | | 0,84 | 0,16 | Ameyaw <i>et al.</i> 2001 |
| EUA (eurodescendentes) | 37 | 0,58 | 0,42 | 0,54 | 0,46 | | 0,46 | 0,54 | Kim <i>et al.</i> 2001 |
| África | | | | | | | | | |
| África do Sul | 110 | | | | | | 0,86 | 0,14 | Chelule <i>et al.</i> 2003 |
| África do Sul (indianos) | 103 | | | | | | 0,42 | 0,58 | Chelule <i>et al.</i> 2003 |
| Gana | 172 | | | | | | 0,90 | 0,10 | Schaeffeler <i>et al.</i> 2001 |
| Gana | 206 | | | | | | 0,83 | 0,17 | Ameyaw <i>et al.</i> 2001 |
| Quênia | 80 | | | | | | 0,83 | 0,17 | Ameyaw <i>et al.</i> 2001 |
| Sudão | 51 | | | | | | 0,73 | 0,27 | Ameyaw <i>et al.</i> 2001 |
| Ásia | | | | | | | | | |
| Arábia Saudita | 96 | | | | | | 0,59 | 0,41 | Ameyaw <i>et al.</i> 2001 |
| China | 96 | 0,28 | 0,72 | 0,38 | 0,50 | 0,12 | 0,47 | 0,53 | Chowbay <i>et al.</i> 2003 |
| China | 132 | | | | | | 0,53 | 0,47 | Ameyaw <i>et al.</i> 2001 |
| China | 98 | | | | | | 0,46 | 0,54 | Balram <i>et al.</i> 2003 |
| Índia | 87 | 0,33 | 0,67 | 0,33 | 0,60 | 0,07 | 0,37 | 0,63 | Chowbay <i>et al.</i> 2003 |
| Índia | 93 | | | | | | 0,38 | 0,62 | Balram <i>et al.</i> 2003 |
| Filipinas | 60 | | | | | | 0,59 | 0,41 | Ameyaw <i>et al.</i> 2001 |
| Japão | 48 | 0,35 | 0,65 | 0,36 | 0,42 | 0,22 | 0,51 | 0,49 | Tanabe <i>et al.</i> 2001 |
| Japão | 50 | | | | | | 0,57 | 0,43 | Schaeffeler <i>et al.</i> 2001 |
| Japão | 114 | | | | | | 0,61 | 0,39 | Sakaeda <i>et al.</i> 2001 |
| Japão | 117 | | | 0,44 | 0,36 | 0,20 | 0,62 | 0,38 | Horinouchi <i>et al.</i> 2002 |
| Japão | 13 | | | 0,39 | 0,46 | 0,15 | 0,54 | 0,46 | Moriya <i>et al.</i> 2002 |
| Malásia | 92 | 0,34 | 0,66 | 0,53 | 0,44 | 0,03 | 0,49 | 0,51 | Chowbay <i>et al.</i> 2003 |
| Malásia | 99 | | | | | | 0,48 | 0,52 | Balram <i>et al.</i> 2003 |
| Rússia | 290 | | | 0,55 | 0,42 | 0,03 | 0,46 | 0,54 | Gaikovitch <i>et al.</i> 2003 |
| Singapura (chineses) | 224 | 0,35 | 0,65 | 0,41 | 0,45 | 0,14 | 0,59 | 0,41 | Lee <i>et al.</i> , 2004 |
| Sudoeste asiático | 89 | | | | | | 0,34 | 0,66 | Ameyaw <i>et al.</i> 2001 |
| Europa | | | | | | | | | |
| Alemanha | 67 | 0,66 | 0,34 | 0,56 | 0,40 | 0,04 | 0,49 | 0,51 | Siegmund <i>et al.</i> 2002 |
| Alemanha | 461 | 0,59 | 0,41 | 0,56 | 0,42 | 0,02 | 0,46 | 0,54 | Cascorbi <i>et al.</i> 2001 |
| Alemanha | 188 | 0,62 | 0,38 | | | | 0,52 | 0,48 | Hoffmeyer <i>et al.</i> 2000 |
| Alemanha | 537 | | | | | | 0,50 | 0,50 | Schaeffeler <i>et al.</i> 2001 |
| Espanha | 408 | | | | | | 0,52 | 0,48 | Bernal <i>et al.</i> 2003 |
| Itália | 106 | | | 0,56 | 0,41 | 0,03 | 0,54 | 0,46 | Furuno <i>et al.</i> 2002 |
| Polônia | 103 | | | | | | 0,51 | 0,49 | Drozdik <i>et al.</i> 2003 |
| Polônia | 139 | 0,59 | 0,41 | 0,58 | 0,41 | 0,01 | 0,48 | 0,52 | Tan <i>et al.</i> , 2004 |
| Polônia | 175 | | | | | | 0,60 | 0,40 | Jamroziak <i>et al.</i> , 2004 |
| Portugal | 100 | | | | | | 0,43 | 0,57 | Ameyaw <i>et al.</i> 2001 |
| Reino Unido | 190 | | | | | | 0,48 | 0,52 | Ameyaw <i>et al.</i> 2001 |
| Reino Unido | 200 | | | | | | 0,47 | 0,53 | Siddiqui <i>et al.</i> 2003 |
| Turquia§ | 62 | | | 0,81 | 0,19 | | 0,40 | 0,60 | Kaya <i>et al.</i> , 2005 |
| Oceania | | | | | | | | | |
| Nova Zelândia§ | 160 | | | | | | 0,47 | 0,53 | Roberts <i>et al.</i> 2002 |

n = número amostral; caselas em branco indicam dados não disponíveis na literatura.

* = frequência de alelos não-G (T + A); § = estudos de casos clínicos.

Impacto clínico dos polimorfismos do gene MDR1

Desde sua descoberta em tumores resistentes à quimioterapia, o papel das proteínas de transporte, especialmente a Pgp, vem sendo amplamente reconhecido, não apenas no tratamento quimioterápico, mas também na absorção, distribuição e eliminação de drogas (Fisher *et al.*, 2005). Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar a influência dos polimorfismos do gene *MDR1* na farmacocinética de diferentes fármacos. Além disso, a participação da Pgp na barreira de proteção do corpo contra diversas substâncias e o fato de defeitos em outros transportadores da família ABC terem sido associados a doenças humanas, vem incentivando a análise do papel da Pgp e dos polimorfismos do gene *MDR1* na susceptibilidade e desenvolvimento de doenças.

Embora muitos estudos busquem analisar o efeito dos diferentes alelos destes polimorfismos na resposta a tratamentos farmacológicos em humanos, nenhuma relação definitiva foi estabelecida ainda. Há controvérsia sobre possíveis efeitos na expressão gênica, na quantidade de proteína expressa na membrana e mesmo no funcionamento desta proteína. Os polimorfismos mais frequentemente analisados são, da mesma forma que nos estudos populacionais, C1236T, G2677T/A e C3435T (visto que geralmente ambas as análises são conduzidas paralelamente), mas ocasionalmente outros também são incluídos nos estudos.

A maior parte das publicações a esse respeito avalia a biodisponibilidade (quantidade de droga disponível no local de ação) de diferentes drogas (sabidamente substratos da Pgp), através da análise de parâmetros farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos. A farmacocinética estuda as fases de absorção, distribuição, metabolização e excreção de um fármaco, analisando a concentração da droga no plasma ou tecido, enquanto a farmacodinâmica estuda o efeito da droga, ambas relacionando estes parâmetros à dose administrada (Okamura *et al.*, 2004). As drogas mais utilizadas para

estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos da Pgp são o antiarrítmico digoxina e os imunossupressores ciclosporina e tacrolimus. Esse tipo de análise fornece uma indicação da atividade da Pgp, uma vez que a biodisponibilidade de uma determinada droga será maior tanto quando for menor o efluxo da mesma mediado por proteínas de transporte. No entanto, como não apenas a Pgp está envolvida na farmacocinética destas drogas, e outras proteínas de transporte e enzimas de metabolização influenciam a absorção e a eliminação das drogas, resultados conflitantes são encontrados.

Os parâmetros utilizados no estudo da farmacocinética geralmente não envolvem o cálculo direto da biodisponibilidade, mas permitem inferências sobre esta. Assim, a análise da concentração de uma droga no sangue ao longo do tempo após sua administração oferece parâmetros que refletem a extensão (quantidade da droga absorvida) e taxa (velocidade de absorção) de biodisponibilidade. Um dos parâmetros mais utilizados é a AUC (*area under the plasma concentration-time curve*) que representa a extensão de absorção através do cálculo da área abaixo da curva de concentração em função do tempo. Além deste, podem ser calculados também a concentração máxima atingida, $C_{m\acute{a}x}$, refletindo tanto a taxa quanto a extensão de absorção, e o tempo até que este pico de concentração seja atingido, $T_{m\acute{a}x}$, representando a velocidade de absorção. Ainda é possível calcular o *clearance* sistêmico, que representa o processo de eliminação por metabolismo e excreção. A análise de vários destes parâmetros, relacionando-os ao genótipo de *MDR1* de cada indivíduo, fornece indicações sobre a influência de cada genótipo na biodisponibilidade de cada droga.

As Tabelas 3 e 4 listam os trabalhos que relacionam a biodisponibilidade de drogas aos genótipos de *MDR1* de acordo com os resultados obtidos. O polimorfismo C1236T é o menos explorado: apenas Nakajima *et al.* (2005) e Fiegenbaum *et al.* (2005) o incluíram

em análises farmacogenéticas. O primeiro não encontrou relação entre os genótipos 1236CC, 1236CT e 1236TT com a biodisponibilidade de paclitaxel em pacientes com câncer de ovário (n=22), enquanto o segundo observou uma melhor resposta ao tratamento com sinvastatina em pacientes com hipercolesterolemia que apresentavam o alelo 1236T.

Tabela 3. Biodisponibilidade de diferentes drogas relacionada ao polimorfismo C3435T

| Droga | Parâmetro | Amostra | Origem | Referência |
|--------------------------------------|--|------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Maior em indivíduos CC | | | | |
| Ciclosporina | AUC, C _{máx} | 10 transplante renal | Euro e afroamericanos | Yates <i>et al.</i> 2003 |
| Digoxina | AUC, t _{máx} | 117 saudáveis | Japoneses | Horinouchi <i>et al.</i> 2002 |
| Digoxina | AUC | 114 saudáveis | Japoneses | Sakaeda <i>et al.</i> 2001 |
| Fexofenadina | AUC | 60 saudáveis | Euro e afroamericanos | Kim <i>et al.</i> 2001 |
| Nelfanavir | nível da droga | 123 HIV | Europeus | Fellay <i>et al.</i> 2002 |
| Maior em indivíduos TT | | | | |
| ^{99m} Tc-MIBI | taxa de eliminação | 66 câncer | Variada | Wong <i>et al.</i> 2005 |
| Ciclosporina | nível da droga | 44 transplante de fígado | Franceses | Bonhomme-Faivre <i>et al.</i> 2004 |
| Ciclosporina | AUC | 10 transplante cardíaco | Chineses | Balram <i>et al.</i> 2003 |
| Ciclosporina | AUC | 14 transplante cardíaco | Ásiáticos | Chowbay <i>et al.</i> 2003 |
| Digoxina | nível da droga | 21 saudáveis | Alemães | Hoffmeyer <i>et al.</i> 2000 |
| Digoxina | AUC | 24 saudáveis | Alemães | Johne <i>et al.</i> 2002 |
| Digoxina | biodisponibilidade | 15 saudáveis | Japoneses | Kurata <i>et al.</i> 2002 |
| Digoxina | AUC | 32 saudáveis | Europeus e africanos | Verstuyft <i>et al.</i> 2003 |
| Etoposide | clearance | 146 saudáveis | Euro e afroamericanos | Kishi <i>et al.</i> 2004 |
| Paclitaxel | AUC, clearance | 22 câncer de ovário | Japoneses | Nakajima <i>et al.</i> 2005 |
| Fenitoína | nível da droga | 96 saudáveis | Turcos | Kerb <i>et al.</i> 2001 |
| Tacrolimus | nível da droga | 180 transplante renal | Variada | Macphee <i>et al.</i> 2005 |
| Tacrolimus | nível da droga | 69 transplante cardíaco pediátrico | Euro e afroamericanos | Zheng <i>et al.</i> 2002 |
| Sem diferença entre genótipos | | | | |
| Ciclosporina | AUC, C _{máx} , t _{máx} | 14 saudáveis | Euro e afroamericanos | Min & Ellingrod, 2002 |
| Ciclosporina | nível da droga | 124 transplante renal | Alemães | von Ahsen <i>et al.</i> 2001 |
| Dicloxacilina | nível da droga | 18 saudáveis | Variada | Putnam <i>et al.</i> 2005 |
| Digoxina | AUC, C _{máx} | 50 saudáveis | Eurodescendentes | Gerloff <i>et al.</i> 2002 |
| Docetaxel | AUC, clearance | 32 saudáveis | Ásiáticos | Goh <i>et al.</i> 2002 |
| Fexofenadina | AUC | 20 saudáveis | Alemães | Drescher <i>et al.</i> 2002 |
| Loperamida | AUC, C _{máx} | 54 saudáveis | Estados Unidos | Pauli-Magnus <i>et al.</i> 2003 |
| Nortriptilina | nível da droga | 78 saudáveis | Neozelandeses | Roberts <i>et al.</i> 2002 |
| Tacrolimus | AUC, C _{máx} , t _{máx} | 39 transplante renal | Japoneses | Tada <i>et al.</i> 2005 |
| Tacrolimus | nível da droga | 72 transplante renal | Alemães | Mai <i>et al.</i> 2004 |
| Tacrolimus | nível da droga | 81 transplante renal | Europeus e africanos | Anglicheau <i>et al.</i> 2003 |
| Tacrolimus | nível da droga | 69 transplante de fígado | Japoneses | Goto <i>et al.</i> 2002 |
| Tacrolimus | nível da droga | 17 transplante de fígado | Japoneses | Yamauchi <i>et al.</i> 2002 |
| Talinolol | AUC | 67 saudáveis | Alemães | Siegmund <i>et al.</i> 2002 |
| Vincristina | AUC, clearance | 52 leucemia linfoblástica aguda | Holandeses | Plasschaert <i>et al.</i> 2004 |

Tabela 4. Biodisponibilidade de diferentes drogas relacionada ao polimorfismo G2677T/A

| Droga | Parâmetro | Amostra | Origem | Referência |
|--------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Maior em indivíduos GG | | | | |
| Digoxina | AUC, $t_{m\acute{a}x}$ | 117 saudáveis | Japoneses | Horinouchi <i>et al.</i> 2002 |
| Fexofenadina | AUC | 60 saudáveis | Euro e afroamericanos | Kim <i>et al.</i> 2001 |
| Maior em indivíduos TT | | | | |
| ^{99m} Tc-MIBI | taxa de eliminação | 66 câncer | Variada | Wong <i>et al.</i> 2005 |
| Ciclosporina | AUC | 14 transplante cardíaco | Asiáticos | Chowbay <i>et al.</i> 2003 |
| Digoxina | AUC | 32 saudáveis | Europeus e africanos | Verstuyft <i>et al.</i> 2003 |
| Digoxina | biodisponibilidade | 15 saudáveis | Japoneses | Kurata <i>et al.</i> 2002 |
| Sinvastatina | redução de colesterol | 99 colesterolemia | Eurobrasileiros | Fiegenbaum <i>et al.</i> 2005 |
| Tacrolimus | nível da droga | 81 transplante renal | Europeus e africanos | Anglicheau <i>et al.</i> 2003 |
| Tacrolimus | nível da droga | 69 transplante cardíaco pediátrico | Euro e afroamericanos | Zheng <i>et al.</i> 2002 |
| Talinolol | AUC | 67 saudáveis | Alemães | Siegmund <i>et al.</i> 2002 |
| Sem diferença entre genótipos | | | | |
| Digoxina | nível da droga | 50 saudáveis | Eurodescendentes | Gerloff <i>et al.</i> 2002 |
| Paclitaxel | AUC, <i>clearance</i> | 22 câncer de ovário | Japoneses | Nakajima <i>et al.</i> 2005 |
| Tacrolimus | nível da droga | 72 transplantes renal | Alemães | Mai <i>et al.</i> 2004 |
| Tacrolimus | nível da droga | 69 transplante de fígado | Japoneses | Goto <i>et al.</i> 2002 |
| Tacrolimus | nível da droga | 17 transplante de fígado | Japoneses | Yamauchi <i>et al.</i> 2002 |
| Vincristina | AUC, <i>clearance</i> | 52 leucemia linfoblástica aguda | Neerlandeses | Plasschaert <i>et al.</i> 2004 |

Diversas publicações apresentam, paralelamente, investigações moleculares como análise da expressão de mRNA, expressão de Pgp e análise de atividade de Pgp (Tabelas 5 e 6). É observada uma grande variação individual na expressão da Pgp (Brinkmann *et al.*, 2002) e não há evidências claras de que um aumento de Pgp esteja associado a um aumento na quantidade de mRNA, por exemplo, nem mesmo evidências de que estas variações possam resultar de diferentes genótipos de *MDR1*. A discordância encontrada entre os resultados destes estudos pode ser devida justamente a esta variação, pois tecidos diferentes estão sendo analisados. Além disso, como já foi citado, Thörn *et al.* (2005), analisando a expressão de mRNA no intestino, observaram um gradiente crescente a partir do estômago em direção ao duodeno da expressão de *MDR1*, demonstrando que mesmo a região analisada do órgão pode influenciar nos resultados, dificultando ainda mais a comparação dos dados de diferentes estudos. Da mesma forma, Albermann *et al.* (2005)

observaram que o nível de expressão de mRNA de *MDR1* em células mononucleares de sangue periférico não está correlacionado com o nível de expressão no intestino e fígado para *MDR1* e outros genes da família de transportadores ABC. Em linhagens isogênicas de camundongos, Schiengold *et al.* (2001) detectaram variações individuais na expressão das três isoformas de MDR em diferentes órgãos durante a ontogenia destes animais. Estes dados sugerem que pode haver variação da expressão de *MDR1* em um mesmo organismo, indicando que outros fatores, além dos polimorfismos deste gene, influenciam esta variação.

Tabela 5. Estudos moleculares relacionados aos genótipos de C3435T

| Conclusão | Amostra | Origem | Referência |
|--|--|------------|------------------------------|
| Expressão de mRNA (PCR <i>real-time</i> ou PCR competitivo) | | | |
| TT>CT>CC | 13 duodeno (saudáveis) | Japoneses | Nakamura <i>et al.</i> 2002 |
| CC=CT=TT | 67 duodeno (saudáveis) | Alemães | Siegmund <i>et al.</i> 2002 |
| CC=CT=TT | 69 enterócitos (transplante de fígado) | Japoneses | Goto <i>et al.</i> 2002 |
| CC=CT=TT | 44 intestino e sangue periférico (doenças gastrointestinais) | NI | Albermann <i>et al.</i> 2005 |
| CC>CT>TT | 123 sangue periférico (saudáveis) | Japoneses | Fellay <i>et al.</i> 2002 |
| CC>CT>TT | 31 células NK CD56 ⁺ (saudáveis) | Japoneses | Hitzl <i>et al.</i> 2001 |
| Expressão de Pgp (Western blot, FACS ou immunostaining) | | | |
| CC>CT>TT | 21 duodeno (saudáveis) | Alemães | Hoffmeyer <i>et al.</i> 2000 |
| CC=CT=TT | 67 duodeno (saudáveis) | Alemães | Siegmund <i>et al.</i> 2002 |
| CC=CT=TT | 100 placenta (saudáveis) | Japoneses | Tanabe <i>et al.</i> 2001 |
| CC=CT=TT | 26 fígado (saudáveis) | Britânicos | Owen <i>et al.</i> 2005 |
| CC>CT>TT | 123 sangue periférico (saudáveis) | Japoneses | Fellay <i>et al.</i> 2002 |
| CC=CT=TT | 43 sangue periférico (saudáveis) | Alemães | Oselin <i>et al.</i> 2003 |
| Atividade de Pgp (efluxo de rodamina) | | | |
| CC>CT>TT | 20 células NK CD56 ⁺ (saudáveis) | Alemães | Drescher <i>et al.</i> 2002 |
| CC>CT>TT | 31 células NK CD56 ⁺ (saudáveis) | Japoneses | Hitzl <i>et al.</i> 2001 |
| CC=CT=TT | 44 intestino e sangue periférico (doenças gastrointestinais) | NI | Albermann <i>et al.</i> 2005 |
| CC=CT=TT | 33 medula (saudáveis) | NI | Calado <i>et al.</i> 2002 |

NI = não informado

| Tabela 6. Estudos moleculares relacionados aos genótipos de G2677T/A | | | |
|--|--|------------|------------------------------|
| Conclusão | Amostra | Origem | Referência |
| Expressão de mRNA (PCR <i>real-time</i> ou PCR competitivo) | | | |
| TT>GT>GG | 13 duodeno (saudáveis) | Japoneses | Moriya <i>et al.</i> 2002 |
| GG=GT/A=TT/A | 67 duodeno (saudáveis) | Alemães | Siegmund <i>et al.</i> 2002 |
| GG=GT/A=TT/A | 44 intestino e sangue periférico (doenças gastrointestinais) | NI | Albermann <i>et al.</i> 2005 |
| Expressão de Pgp (Western blot, FACS ou immunostaining) | | | |
| GG=GT/A=TT/A | 67 duodeno (saudáveis) | Alemães | Siegmund <i>et al.</i> 2002 |
| TT>GT>GG | 60 células HEK293T | - | Kim <i>et al.</i> 2001 |
| TT/A>GT/A>GG | 100 placenta (saudáveis) | Japoneses | Tanabe <i>et al.</i> 2001 |
| GG=GT/A=TT/A | 26 Fígado (saudáveis) | Britânicos | Owen <i>et al.</i> 2005 |
| Atividade de Pgp (efluxo de rodamina) | | | |
| GG=GT/A=TT/A | 44 intestino e sangue periférico (doenças gastrointestinais) | NI | Albermann <i>et al.</i> 2005 |

NI = não informado

Em 1998, Panwala *et al.* observaram que camundongos nocaute para *mdr1a* (*mdr1a*^{-/-}), homólogo ao *MDR1* humano, desenvolvem uma inflamação intestinal espontânea em condições livres de patógenos. As doenças inflamatórias intestinais não têm a etiologia completamente compreendida, mas sugere-se que uma reação imunológica hipersensitiva esteja envolvida na inflamação crônica. Visto que camundongos *mdr1a*^{-/-} possuem um sistema imunológico normal, foi sugerido que a susceptibilidade à inflamação estivesse relacionada a falhas na barreira epitelial intestinal. No caso do camundongo *mdr1a*^{-/-}, a ausência da glicoproteína P, responsável por essa barreira, poderia ter levado ao desenvolvimento da inflamação, mas alterações na expressão do gene ou na função da proteína podem, eventualmente, ter o mesmo efeito. Mais tarde, Schwab *et al.* (2003b) demonstraram que o alelo 3435T está associado com susceptibilidade a colite ulcerativa, uma doença inflamatória intestinal humana.

Considerando este importante papel de *MDR1* na proteção contra xenobióticos, e também pelo fato dos substratos da Pgp incluírem diversas drogas terapêuticas, muitos outros trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de elucidar os possíveis efeitos dos alelos, genótipos e fenótipos apresentados por *MDR1* na susceptibilidade a doenças e na

evolução e resposta a tratamentos farmacológicos. As Tabelas 7 e 8 apresentam os detalhes dos estudos publicados a este respeito com relação aos polimorfismos C3435T e G2677T/A, respectivamente.

O único trabalho envolvendo o polimorfismo C1236T descreve uma relação do genótipo TT com maior sobrevida em pacientes com leucemia mielóide aguda (Illmer *et al.*, 2002). Estes mesmo autores também observaram a relação dos genótipos 3435TT e 2677TT com maior sobrevida, e indicaram a existência de desequilíbrio de ligação entre estes alelos. É importante salientar que, em estudos de associação entre marcadores e doenças, as associações descritas podem tanto indicar que os genótipos estão de fato relacionados aos fenótipos descritos, como, eventualmente, indicar que há ligação a outros locos, estes sim diretamente relacionados aos fenótipos (Schwab *et al.*, 2003a).

Tabela 7. Relação do polimorfismo C3435T com quadro clínico ou susceptibilidade à doenças

| Investigação | n | Origem | Referência |
|---|-----|-----------------------|------------------------------|
| 3435 CC=CT=TT | | | |
| Sobrevida em leucemia linfoblástica aguda | 53 | NI | Efferth <i>et al.</i> 2003 |
| Resposta CD4 ao tratamento de HIV | 149 | Eurodescendentes | Nasi <i>et al.</i> 2003 |
| Susceptibilidade a infecção por HIV | 137 | Eurodescendentes | Ifergan <i>et al.</i> 2002 |
| Progressão de HIV pré-tratamento | 411 | NI | Bleiber <i>et al.</i> 2004 |
| Tempo em supressão viral (HIV) | 461 | Variada | Brumme <i>et al.</i> 2003 |
| Susceptibilidade à Doença de Crohn | 126 | Alemães | Schwab <i>et al.</i> 2003b |
| 3435 TT>CT>CC | | | |
| Susceptibilidade à tumor renal | 212 | Alemães | Siegsmond <i>et al.</i> 2002 |
| Sobrevida em leucemia mielóide aguda | 405 | NI | Illmer <i>et al.</i> 2002 |
| Resposta à quimioterapia em câncer de mama | 68 | NI | Kafka <i>et al.</i> 2003 |
| Susceptibilidade à colite ulcerativa | 149 | Alemães | Schwab <i>et al.</i> 2003b |
| Susceptibilidade ao Mal de Parkinson | 95 | Italianos | Furuno <i>et al.</i> 2002 |
| Susceptibilidade ao Mal de Parkinson | 107 | Poloneses | Drozdik <i>et al.</i> 2003 |
| Remissão após tratamento em Artrite Reumatóide | 92 | Poloneses | Pawlik <i>et al.</i> , 2004 |
| Resposta à antiepilépticos | 315 | Britânicos | Siddiqui <i>et al.</i> 2003 |
| Resposta CD4 ao tratamento de HIV | 80 | Europeus | Fellay <i>et al.</i> 2002 |
| Hipotensão induzida por antidepressivo | 78 | Neozelandeses | Roberts <i>et al.</i> 2002 |
| 3435 CC>CT>TT | | | |
| Tempo em tratamento com esteróides após transplante cardíaco pediátrico | 69 | Euro e afroamericanos | Zheng <i>et al.</i> 2002 |

NI = não informado

Tabela 8. Relação do polimorfismo G2677T com quadro clínico ou susceptibilidade à doenças

| Investigação | n | Origem | Referência |
|---|-----|-----------------------|----------------------------|
| 2677 GG=GT=TT | | | |
| Progressão de HIV pré-tratamento | 411 | NI | Bleiber <i>et al.</i> 2004 |
| Susceptibilidade ao Mal de Parkinson | 95 | Italianos | Furuno <i>et al.</i> 2002 |
| 2677 TT>GT>GG | | | |
| Sobrevida em leucemia mielóide aguda | 405 | NI | Illmer <i>et al.</i> 2002 |
| 2677 GG>GT>TT | | | |
| Tempo em tratamento com esteróides após transplante cardíaco pediátrico | 69 | Euro e afroamericanos | Zheng <i>et al.</i> 2002 |

NI = não informado

Lupus eritematoso sistêmico

Lupus eritematoso sistêmico (SLE, OMIM152700) é uma doença autoimune que se caracteriza pela formação de anticorpos dirigidos contra vários autoantígenos, especialmente DNA dupla fita e pequenas ribonucleoproteínas (Riemekasten & Hahn, 2005). Esta é uma doença inflamatória crônica do tecido conectivo, afetando a pele e vários órgãos internos. As características típicas da doença são a presença de uma mancha vermelha na face, afetando nariz e bochechas (eritema malar), artrite e dano progressivo nos rins devido à formação de imunocomplexos. Seguidamente coração, pulmões e cérebro são também afetados por ataques progressivos de inflamação e fibrose. A Tabela 9 lista os critérios de diagnóstico propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) em 1982, revisados por Sato *et al.*, (2002) e Petri (2005). A presença de quatro destes indicadores é suficiente para confirmar o diagnóstico de SLE. A prevalência, em populações de origem européia, é de 0,05% (Gudmundsson & Steisson, 1990) e a incidência é maior em mulheres (nove a dez casos em mulheres para cada caso diagnosticado em homens), especialmente na fase reprodutiva (Sato *et al.*, 2002). O tratamento é feito principalmente com corticosteróides e imunossuppressores, especialmente ciclofosfamida (revisão em O'Neill & Schrieber, 2005 e Vasoo & Hughes, 2005).

Tabela 9. Critérios para o diagnóstico de SLE

| | |
|----|---|
| 1 | Eritema malar: lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo. |
| 2 | Lesão discóide: lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia. |
| 3 | Fotossensibilidade: exantema cutâneo, como reação não usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou conforme observado pelo médico. |
| 4 | Úlceras orais/nasais: úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico. |
| 5 | Artrite: artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular. |
| 6 | Serosite: pleuris (caracterizada por história convincente de dor pleurítica ou atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentada por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico). |
| 7 | Comprometimento renal: proteinúria persistente ou cilindrúria anormal. |
| 8 | Alterações neurológicas: convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa). |
| 9 | Alterações hematológicas: anemia hemolítica ou leucopenia (menos de 4.000 leucócitos/ml em duas ou mais ocasiões), linfopenia (menos de 1.500 linfócitos/ml em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menos de 100.000 plaquetas/ml na ausência de outra causa). |
| 10 | Alterações imunológicas: anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm, ou presença de anticorpo antifosfolípide baseado em: a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina; b) teste positivo para anticoagulante lúpico ou teste falso-positivo para sífilis, por no mínimo seis meses. |
| 11 | Anticorpos antinucleares: título anormal de anticorpo anti-nuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lupus induzido por drogas. |

Lupus é uma doença considerada “complexa” por resultar tanto de fatores genéticos, quanto da atuação de fatores ambientais (Prokunina & Alarcon-Riquelme, 2004). Estudos de associação identificaram como genes candidatos (que apresentam alelos ou haplótipos de risco, conferindo susceptibilidade ao lupus) MHC classe II, *FCGR2A* e *FCGR3A* (receptores de baixa afinidade para a região Fc da IgG) e *PDCD1* (morte celular programada 1), além de deficiências em componentes do sistema complemento (como C1q, C1r, C1s, C4A e C2) (Tsao, 2004), entre outros. Quanto aos fatores ambientais, já foi demonstrado que exposição a diferentes compostos químicos, tais como aminas e hidrazinas aromáticas, sílica, silicone, vinil clorídrico, solventes orgânicos e metais pesados, pode estar associada ao lupus (revisões em Edwards, 2005 e Parks & Cooper, 2005). Títulos elevados de anticorpos contra vírus como rubéola e Epstein-Barr (EBV),

além da prevalência aumentada de exposição prévia ao EBV em indivíduos com lupus, sugerem que infecções virais podem também interferir no desenvolvimento de lupus (Edwards, 2005).

A resistência a múltiplas drogas tem sido bastante abordada no contexto das doenças autoimunes. Pacientes com SLE têm baixa resposta a tratamentos com glicocorticóides e apresentam um aumento da atividade da Pgp nos linfócitos de sangue periférico, embora estes dados sejam de difícil interpretação, pois a função desta proteína nestas células ainda não é bem compreendida (Diaz-Borjon *et al.*, 2000; Llorente *et al.*, 2000). Dessa forma, considerando que esteróides são substratos para a Pgp, sugere-se que o aumento de atividade desta proteína esteja envolvida com um efluxo maior dos esteróides, reduzindo o efeito terapêutico em pacientes tratados por longos períodos (Richaud-Patin *et al.*, 2004a). Os polimorfismos aqui apresentados descritos para *MDR1* parecem estar envolvidos com a variação da atividade da Pgp, sugerindo a importância do estudo destes em doenças autoimunes. A genotipagem de pacientes com SLE e a verificação de seus históricos clínicos poderá fornecer dados que contribuam para o estabelecimento de protocolos de tratamento que levem em consideração variações individuais na resposta a fármacos.

OBJETIVOS

1. Genotipar uma amostra de 137 pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e 143 indivíduos do banco de DNA controle de Caucasoídes do Laboratório de Hemostasia da UFRGS quanto aos polimorfismos dos exons 12 (C1236T), 21 (G2677T/A) e 26 (C3435T) do gene *MDR1*.
2. Verificar a existência de desequilíbrio de ligação entre estes polimorfismos nestas amostras populacionais.
3. Caracterizar a população brasileira descendente de Europeus (representada na amostra controle) quanto a estes polimorfismos, comparando os resultados obtidos com os descritos para outros grupos étnicos e populações humanas.
4. Relacionar o genótipo de cada paciente com seu histórico clínico.
5. Contribuir para o entendimento do papel destes polimorfismos no desenvolvimento e tratamento do lupus.

***ABCB1* C1236T, G2677T/A and C3435T polymorphisms in systemic lupus erythematosus**

Tatiana Pereira Gonzalez¹, João Carlos Brenol², Ricardo Xavier², Marion Schiengold¹,
José Artur Bogo Chies¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Porto Alegre,
RS, Brazil

² Rheumatology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre,
Brazil

Correspondence to:

Dr. José Artur Bogo Chies

Departamento de Genética , UFRGS

Av. Bento Gonçalves 9500 – C.P. 15053

91501-970 Porto Alegre, RS – Brazil

Phone: 55-51-33166740

Fax: 55-51-33197311

E-mail: jabchies@terra.com.br

Keywords: *ABCB1*, *MDR1*, P-glycoprotein, polymorphism, systemic lupus erythematosus

Running title: *ABCB1* polymorphisms in lupus

(Trabalho a ser submetido à revista *British Journal of Clinical Pharmacology*)

Summary

Aims

The aim of this study was to investigate the frequency of the single nucleotide polymorphisms C1236T, G2677T/A, and C3435T of the *ABCBI* gene in Brazilians with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls.

Methods

ABCBI polymorphisms C1236T, G2177T/A, and C3435T were determined in 137 SLE patients and 143 healthy subjects by PCR-RFLP analysis. Haplotype frequencies were estimated by a maximum-likelihood method using Arlequin software.

Results

The 1236C, 2677G and 3435C allele frequencies in SLE patients were 0.62, 0.63 and 0.55, respectively. No statistically significant differences were observed between SLE and healthy subjects (0.63, 0.62, 0.55, 1236C, 2677G and 3435C, respectively). All genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium. The three loci are in linkage disequilibrium. *ABCBI* genotype and allele frequencies and haplotype distribution in SLE patients with arthritis, oral ulcers or renal disorder were not different from those observed in patients without these clinical characteristics. The 2677A allele was more frequent in patients presenting malar rash than in patients without this clinical characteristic ($P = 0.005$). The 2677TA genotype and 2677A allele were more frequent in patients presenting pleuritis ($P = 0.007$ and 0.016, respectively).

Conclusions

ABCBI polymorphisms do not seem to have impact on lupus susceptibility, but may be involved in development of single clinical characteristics. Further analysis of the impact of the 2677A allele in pleuritis and other immunologic processes associated to SLE are necessary.

Introduction

The *ABCB1* (also *MDR1*) gene product P-glycoprotein (P-gp) is an ATP-dependent drug efflux pump first discovered in cancer cells, where it contributes to the development of multidrug resistance (MDR) during chemotherapy. Although the physiological role of P-gp is not completely understood, this molecule is important to the protection against xenobiotics and is detected in several human tissues, including the placenta, testis, blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier [1]. P-gp also plays a role in drug absorption in the gastrointestinal tract and in drug elimination via bile and urine [2]. In addition, P-gp has been detected in hematopoietic stem cells, peripheral blood mononuclear cells, mature macrophages, natural killer cells, antigen-presenting dendritic cells, and T and B lymphocytes [3].

ABCB1 is a highly polymorphic gene and, to date, 28 SNPs have been described at 27 positions [4, 5]. Among all 15 SNPs reported in the first systematic screening of *ABCB1* gene, only a synonymous SNP in exon 26 (C3435T) was shown to have some functional significance, as the 3435T allele correlates with decreased enterocyte *ABCB1* mRNA expression and low *in vivo* activity of P-gp [6]. Recently, it has been suggested that the *ABCB1* mRNA stability is decreased for the 3435T allele, which leads to low steady-state *ABCB1* mRNA levels [7]. Nevertheless, several other studies present conflicting results. It has been reported that high *ABCB1* mRNA levels were associated with 3435T allele [8], while other studies [9, 10] failed to show any correlation between C3435T alleles and *ABCB1* mRNA expression levels. The same conflicting situation is observed to P-gp activity and expression.

Two other SNPs (synonymous C1236T and nonsynonymous G2677T/A) have also been particularly studied. The effects of G2677T/A SNP in *ABCB1* mRNA and Pgp

expression levels were also studied and, while some indicated higher levels in 2677TT/A subjects [11, 12, 13], others showed no expression levels differences between genotypes [9, 14]. The frequencies of *ABCB1* allelic variants differ among different ethnic groups and linkage disequilibrium is reported between the alleles in positions 1236, 2677, and 3435 [12].

The effects of *ABCB1* polymorphisms on disposition of P-gp drug substrates have also been studied and more conflicting results have been revealed. Anticancer agents (e. g. etoposide), immunosuppressants (e. g., ciclosporin, tacrolimus), antiarrhythmics (e. g. digoxin), and other drugs have been evaluated in these studies. For example, no significant effects of *ABCB1* genotypes were observed in cyclosporin A (CsA) pharmacokinetics in stable renal transplant patients [15] and healthy subjects [16]. However, 3435TT liver transplant recipients required approximately 50% lower weight-adjusted CsA dose than 3435CC [17] and the AUC (area under the plasma concentration-time curve) was found to be higher in 3435TT heart transplant patients compared to 3435CC [18, 19]. The opposite was observed in renal transplant patients, and 3435TT subjects presented lower AUC compared to other genotypes [20]. Although a great number of studies investigating the influence of *ABCB1* polymorphisms, especially C3435T, on drug pharmacokinetics have been published, the functional significance of these SNPs on drug disposition is not yet clear.

High activity of P-gp has been detected in some autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE) [21], which is a chronic rheumatic disease with an autoimmune etiology [22]. It is characterized by the production of a variety of auto antibodies, nuclear components of the cells being the main target of the autoimmune reaction. It affects mainly women during childbearing ages and its prevalence has been

estimated at 0.05% in Caucasian populations [23]. The therapy for SLE includes the use of corticosteroids and immunosuppressants [24, 25], that are substrates to P-gp. Therefore, we analyzed the allelic and genotypic frequencies for C1236T, G2677T/A, and C3435T polymorphisms in healthy Brazilian subjects with European ancestry and in patients with SLE.

Methods

Subjects

One hundred and thirty seven patients (16 men and 121 women; 102 of European ancestry and 35 of African ancestry) with systemic lupus erythematosus and one hundred and forty three healthy subjects with European origin (102 men and 41 women) aged 27-59 years (mean age: 45, SD: 7) were studied. Patients were diagnosed according to the criteria of the American College of Rheumatology and were recruited in the Rheumatology Division, Hospital de Clínica de Porto Alegre in Porto Alegre, Brazil. This study was approved by the local Ethics Committee and written informed consent was obtained from all subjects.

ABCBI polymorphisms genotyping

Genomic DNA was extracted from venous blood using the method described by Lahiri & Nurnberger [26] and screened for the SNPs using PCR-RFLP analysis. Genotyping was performed as previously described for C1236T and G2677T/A [27] and C3435T [28] polymorphisms.

Statistical analysis

Genotype distribution and allelic frequencies were estimated by gene counting. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was determined by chi-square tests and linkage disequilibrium and haplotype frequencies were estimated by use of the Arlequin software (version 2.000) [29]. The determination of statistically significant differences in genotype and allele frequency between groups was assessed by chi-square tests or when appropriate, by Fisher's exact test using WINPEPI [30]. A significance level of 0.05 was used.

Results

Frequency of *ABCB1* C1236T, G2677T/A, and C3435T polymorphic alleles are shown in Table 1. The observed frequencies of the genotypes of all three polymorphisms in both groups were consistent with Hardy–Weinberg equilibrium ($P > 0.5$). No statistically significant differences were observed in allelic distribution between men and women in both groups (data not shown). Allelic frequencies and 95% confidence intervals in patients and control groups are shown in Table 2. No statistically significant differences were observed in genotypic or allelic frequencies between patients and control groups. Allelic frequencies for C3435T are statistically significantly different between patients with African and European ancestry (Table 2).

Clinical records included the presence of the following symptoms (number of patients in parenthesis): malar rash (n = 69), arthritis (n = 108), oral ulcers (n = 41), pleuritis (n = 34), renal disorder (n = 70), and neurological disorder (n = 21). For C3435T only patients with European ancestry were analyzed for C3435T, since sub grouping of patients with African ancestry resulted in groups without a sufficient number of individuals. No statistically significant differences in genotypic or allelic frequencies were observed between the groups of patients with vs. without arthritis, oral ulcers, renal disorder or neurologic disorder (data not shown). G2677T/A allelic frequencies were found to be statistically significantly different between patients grouped according to the presence of malar rash (Table 3). The 2677G allele was more frequently observed in the group presenting this clinical feature while 2677T and A alleles were observed in higher frequencies in the group of patients that did not developed malar rash. For pleuritis, genotypic and allelic frequencies were statistically significantly different (Table 3). Both

2677TA genotype and 2677A allele were detected in higher frequencies in the group that developed pleuritis as compared to the group that did not presented this characteristic.

Haplotypic frequencies were estimated by a maximum-likelihood method for both patients and control groups, and for all subgroups of patients. The most frequently observed haplotypes were 1236C/2677G/3435C and 1236T/2677T/3435T, accounting respectively for 45% and 27.5% of all haplotypes in SLE and control group. Haplotype distribution in the subgroups of patients was not statistically significantly different between patients with vs. without any of the clinical features (data not shown).

Discussion

In this study, we present data relative to the frequencies of *ABCB1* more commonly studied SNPs in a sample of Brazilian individuals with European ancestry. No differences were observed among Brazilians with European ancestry and published data from Italian [31], Spanish [32], and German [9] individuals. C3435T allelic frequencies in our European-derived individuals differ from that observed in Portugal [33] (data not shown). Patients with African ancestry included in our study presented the 3435C allele in a higher frequency than patients with European ancestry. This feature was already observed for other populations from Africa or with African ancestry [33].

The aim of this study was to determine the frequency of alleles and genotypes for *ABCB1* C1236T, G2677T/A, and C3435T polymorphisms in SLE and in subgroups of patients with different clinical characteristics. The genotypic, allelic and haplotypic distribution in SLE patients did not differ from that in healthy subjects. The polymorphism C3435T has been already analyzed in rheumatoid arthritis [34] and no statistically differences were observed in genotypic or allelic frequencies between patients and healthy subjects. These data suggest that *ABCB1* polymorphisms are not important risk factors for these autoimmune diseases, although more studies are necessary to clearly establish whether this is also true for other autoimmune diseases.

P-gp activity was reported to be increased in lymphocytes from SLE patients [21] and also in three other autoimmune disorders (rheumatoid arthritis [35], thrombocytopenic purpura [36], and myasthenia gravis [37]). In all cases, patients with active disease or patients that were refractory to treatment presented the highest levels of P-gp activity.

Although *ABCB1* polymorphisms do not seem to influence disease susceptibility, analysis of patients with different clinical characteristics indicates that they may interfere

on disease development. The 2677A allele frequency was decreased in patients with malar rash, which is one of the most frequent manifestations of SLE. On the other hand, the frequency of the 2677A allele was increased in patients presenting pleuritis. Only 25% (34 out of 137 subjects) of the patients developed pleuritis, but 70% (5 out of 7 subjects) of the patients carrying a 2677A allele showed this feature. These findings are intriguing, since malar rash development involves a Th2 type immune response and pleuritis, an inflammatory process, a Th1 type immune response. Thus, our results can suggest an involvement of the 2677A allele in immune response. It has been already suggested that P-gp may be involved in immunological processes. Cytokines may be transported by P-gp, particularly IL-2, IL-4 and INF- γ [38, 39], and pro inflammatory cytokines seems to increase *ABCB1* mRNA expression. Unfortunately, no data are available linking the *ABCB1* polymorphisms and immunological processes. It would be interesting to analyze the frequency of SLE patients which develop pleuritis in Asian populations, since in these populations the 2677A allele frequency is higher than in others [4]. The analysis of this polymorphism in individuals who developed pleuritis unrelated to SLE context may be interesting.

Thus, our data suggest that the *ABCB1* polymorphisms do not interfere in SLE susceptibility and that the evaluation of the polymorphisms analyzed, especially the 2677A allele, in immunological processes may be interesting. Also, we presented information on the allelic and genotype frequencies for C1236T, G2677T/A, and C3435T polymorphisms in European- and African-derived individuals from the Brazilian population.

References

- 1 Fromn MF. The influence of MDR1 polymorphisms on p-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54:1295-310.
- 2 Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrugresistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84:7735–8.
- 3 Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* 1994; 83:2451-8.
- 4 Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75:13-33.
- 5 Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human *MDR1* drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43:285-307.
- 6 Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaun M, Brinkmann U. 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; 97:3473-8.
- 7 Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15:693-704.
- 8 Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1

- gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 71:297-303.
- 9** Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B, Warzok R, Kroemer HK, Cascorbi I. The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72:572-83.
- 10** Goto M, Masuda S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K, Inui K. C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2002; 12:451-7.
- 11** Moriya Y, Nakamura T, Hourinouchi M, Sakaeda T, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Gotoh A, Fujimoto S, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K. Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese. *Biol Pharm Bull* 2002; 25:1356-9.
- 12** Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwartz UI, Taylor A, Xie H, McKinsey J, Zhou S, Lan L, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR. Identification of functionally variant *MDR1* alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70:189-99.
- 13** Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297:1137-43.

- 14 Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK, Pirmohamed M. Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. *Br J Clin Pharmacol* 2005; 59:365-70.
- 15 von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No Influence of the *MDR-1* C3435T Polymorphism or a *CYP3A4* Promoter Polymorphism (*CYP3A4-V* Allele) on Dose-adjusted Cyclosporin A Trough Concentrations or Rejection Incidence in Stable Renal Transplant Recipients. *Clin Chem* 2001; 47:1048-52.
- 16 Min DI, Ellingrod VL. C3435T mutation in exon 26 of the human MDR1 gene and cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit* 2002; 24:400-4.
- 17 Bonhomme-Faivre L, Devocelle A, Saliba F, Chatled S, Maccario J, Farinotti R, Picard V. MDR-1 C3435T polymorphism influences cyclosporine a dose requirement in liver-transplant recipients. *Transplantation* 2004; 78:21-5.
- 18 Balram C, Sharma A, Sivathasan C, Lee EJ. Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic-genotypic correlates. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56:78-83.
- 19 Chowbay B, Kumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q, Lee EJ. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics* 2003; 13:89-95.
- 20 Yates CR, Zhang W, Song P, Li S, Gaber AO, Kotb M, Honaker MR, Alloway RR, Meibohm B. The Effect of CYP3A5 and MDR1 Polymorphic Expression on Cyclosporine Oral Disposition in Renal Transplant Patients. *J Clin Pharmacol* 2003; 43:555-64.

- 21 Díaz-Borjon A, Richaund-Patin Y, Alvarado De La Barrera C, Jakez-Ocampo J, Ruiz-Arguelles A, Llorente L. Multidrug resistance-I (MDR-I) 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; 67:40-8.
- 22 Prokunina L, Alarcon-Riquelme M. The genetic basis of systemic lupus erythematosus – knowledge of today and thoughts for tomorrow. *Hum Mol Genet* 2004; 13:R143-8.
- 23 Gudmundsson S, Steinsson K. Systemic lupus erythematosus in Iceland 1975 through 1984. A nationwide epidemiological study in an unselected population. *J Rheumatol* 1990; 17:1162-7.
- 24 O'Neill SG, Schrieber L. Immunotherapy of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2005; 4:395-402.
- 25 Vasoo, S, Hughes, GRV. Theory, targets and therapy in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2005; 14:181-8.
- 26 Lahiri, DK, Nurnberger, JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:5444.
- 27 Cascorbi I, Gerlogg T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter *MDR1* gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69:169-74.
- 28 Roberts R, Joyce P, Mulder RT, Begg EJ, Kennedy MA. A common P-glycoprotein polymorphism in associated with nortriptyline-induced postural hypertension in patients treated for major depression. *Pharmacogenomics J* 2002; 2:191-6.

- 29 Schneider S, Roessli D, Excoffier L, Arlequin V. A software for population genetics data analysis. Geneva (Switzerland): University of Geneva 2000.
- 30 Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows) computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic Perspectives, Innovations* 2004; 1:6 (available on the Internet at www.epi-perspectives.com/content/1/1/6).
- 31 Furuno T, Landi MT, Ceroni M, Caporaso N, Bernucci I, Nappi G, Martignoni E, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Expression polymorphism of the blood-barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 2002; 12:529-34.
- 32 Bernal ML, Sinues B, Fanlo A, Mayayo E Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population, *Ther Drug Monit* 2003; 25:107-11.
- 33 Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA, McLeod HL. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; 11:217-21.
- 34 Pawlik A, Wrzesniewska J, Fiedorowick-Fabrycy I, Gawronska-Szklarz B. The MDR1 3435 polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42:496-503.
- 35 Llorente L, Richaund-Patin Y, Díaz-Borjon A, Alvarado-de la Barrera C, Jakez-Ocampo J, de la Fuente H, Gonzalez-Amaro R, Díaz-Jouanen E. Multidrug resistance-I (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part I: increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients might influence disease outcomes. *Joint Bone Spine* 2000; 67:30-9.

- 36** Ruiz-Soto R, Richaud-Patin Y, López-Karpovitch X, Llorente L. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in autoimmune disorders III: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from immune thrombocytopenic púrpura patients. *Exp Hematol* 2003; 31: 483-7.
- 37** Richaud-Patin Y, Vega-Boada F, Vidaller A, Llorente L. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in autoimmune disorders IV. P-glycoprotein overfunction in lymphocytes from myasthenia gravis patients. *Biomed Pharmacother* 2004; 58:320-4.
- 38** Park SW, Lomri N, Simeoni LA, Fruehauf JP, Mechetner E. Analysis of P-glycoprotein-mediated membrane transport in human peripheral blood lymphocytes using the UIC2 shift assay. *Cytometry A* 2003; 53:67-78.
- 39** Drach J, Gsur A, Hamilton G, Zhao S, Angerler J, Fiegl M, Zojer N, Raderer M, Haberl I, Andreeff M, Huber H. Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes. *Blood* 1996; 88:1747-54.

Table 1. Distribution of *ABCB1* C1236T, C3435T and G2677T/A genotypes in SLE (n= 137) and in healthy subjects (n = 143).

| <i>SNP</i> | <i>Group</i> | <i>Genotypes</i> | | | | | |
|-------------------|--------------|------------------|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
| C1236T | | CC | | CT | | TT | |
| | SLE | 51 (37.2%) | | 69 (50.4%) | | 17 (12.4%) | |
| | Control | 56 (39.2%) | | 67 (46.8%) | | 20 (14.0%) | |
| <i>P</i> = 0.8543 | | | | | | | |
| G2677T/A | | GG | GT | TT | GA | TA | AA |
| | SLE | 53 (38.7%) | 65 (47.4%) | 12 (8.8%) | 3 (2.2%) | 4 (2.9%) | 0 (0.0%) |
| | Control | 57 (39.9%) | 58 (40.5%) | 22 (15.4%) | 4 (2.8%) | 2 (1.4%) | 0 (0.0%) |
| <i>P</i> = 0.3822 | | | | | | | |
| C3435T | | CC | | CT | | TT | |
| | SLE | 38 (27.7%) | | 76 (55.5%) | | 23 (16.8%) | |
| | Control | 47 (32.9%) | | 61 (42.6%) | | 35 (24.5%) | |
| <i>P</i> = 0.0859 | | | | | | | |

Data are presented as number of observed individuals (%)

Table 2. Comparisons of allele frequencies between patients with SLE and controls and between patients of African ancestry (AA) and European ancestry (EA).

| SNP | | 1236 | | 2677 | | | 3435 | |
|------------------|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <i>Group (n)</i> | | <i>C</i> | <i>T</i> | <i>G</i> | <i>T</i> | <i>A</i> | <i>C</i> | <i>T</i> |
| Control | (143) | 0.63 (0.57, 0.68) | 0.37 (0.32, 0.43) | 0.62 (0.56, 0.67) | 0.36 (0.31, 0.42) | 0.02 (0.00, 0.04) | 0.55 (0.48, 0.60) | 0.45 (0.40, 0.51) |
| SLE | (137) | 0.62 (0.57, 0.68) | 0.38 (0.32, 0.43) | 0.63 (0.58, 0.69) | 0.34 (0.28, 0.39) | 0.03 (0.01, 0.04) | 0.55 (0.49, 0.61) | 0.45 (0.39, 0.50) |
| <i>P</i> value | | 1.0000 | | 0.8031 | | | 0.8340 | |
| SLE | AA (35) | 0.71 (0.60, 0.82) | 0.29 (0.18, 0.39) | 0.74 (0.64, 0.84) | 0.23 (0.13, 0.33) | 0.03 (0.00, 0.07) | 0.67 (0.56, 0.78) | 0.33 (0.22, 0.44) |
| SLE | EA (102) | 0.59 (0.52, 0.66) | 0.41 (0.34, 0.47) | 0.60 (0.53, 0.66) | 0.38 (0.31, 0.44) | 0.02 (0.00, 0.04) | 0.51 (0.45, 0.58) | 0.49 (0.42, 0.55) |
| <i>P</i> value | | 0.0940 | | 0.0573 | | | 0.0430 | |

Data are shown as frequency (95% confidence interval).

Table 3. G2777T/A genotype and allele frequencies in patients with and without malar rash and pleuritis.

| | <i>Malar rash positive</i> (n = 69) | | <i>Malar rash negative</i> (n = 68) | | <i>Pleuritis positive</i> (n = 34) | | <i>Pleuritis negative</i> (n = 103) | |
|---------------------|--|-------|--|-------|---------------------------------------|------|--|-------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 2677 | | | | | | | | |
| GG (n = 53) | 28 | 40.5 | 25 | 36.9 | 15 | 44.1 | 38 | 36.9 |
| GT (n = 65) | 36 | 52.2 | 29 | 42.5 | 13 | 38.2 | 52 | 50.5 |
| TT (n = 12) | 4 | 5.8 | 8 | 11.8 | 1 | 2.95 | 11 | 10.7 |
| GA (n = 3) | 0 | 0.0 | 3 | 4.4 | 1 | 2.95 | 2 | 1.9 |
| TA (n = 4) | 1 | 1.5 | 3 | 4.4 | 4 | 11.8 | 0 | 0.0* |
| <i>P</i> | | | 0.2004 | | | | 0.00710 | |
| G | | 0.667 | | 0.53* | | 0.65 | | 0.63 |
| T | | 0.336 | | 0.43* | | 0.28 | | 0.36 |
| A | | 0.007 | | 0.04* | | 0.07 | | 0.01* |
| <i>P</i> | | | 0.0054 | | | | 0.0156 | |
| <i>*P < 0.05</i> | | | | | | | | |

A expressão de Pgp já foi estudada em doenças autoimunes como artrite reumatóide, púrpura trombocitopênica e miastênia grave, além de lupus eritematoso sistêmico. A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crônica das articulações que leva à destruição progressiva de cartilagens e ossos, púrpura trombocitopênica se caracteriza pelo baixo nível de plaquetas no sangue em consequência de uma destruição mediada por anticorpos e a miastênia grave é uma doença neuromuscular caracterizada por fraqueza muscular e fadiga.

Llorente *et al.* (2000) observaram que pacientes com artrite reumatóide apresentaram um número aumentado de linfócitos com atividade elevada de Pgp em relação a indivíduos saudáveis e que esse aumento parecia estar associado a um desenvolvimento clínico desfavorável da doença e com baixa resposta ao tratamento. Alta atividade da Pgp também foi observada em linfócitos de pacientes com púrpura trombocitopênica (Levy *et al.*, 2002; Ruiz-Soto *et al.*, 2003). Ruiz-Soto *et al.* observaram ainda que pacientes refratários ao tratamento tinham maior atividade de Pgp em relação aos demais. Esta situação se repetia em pacientes com miastênia grave: maior atividade de Pgp foi detectada em pacientes em relação a um grupo controle e, entre os pacientes, foram aqueles refratários ao tratamento que apresentam os maiores níveis de atividade (Richaud-Patin *et al.*, 2004b).

Com relação ao lupus eritematoso sistêmico, Diaz-Borjon *et al.* (2000) observaram um maior número de linfócitos apresentando atividade de Pgp em pacientes do que em indivíduos saudáveis e menor atividade de Pgp no grupo de pacientes em remissão em

relação àqueles que apresentavam a doença ativa. Da mesma forma, Tsujimura *et al.* (2005) detectaram níveis significativamente maiores de expressão de Pgp em linfócitos de pacientes quando comparados a um grupo controle. Estes autores também observaram que o grupo de pacientes com baixa resposta ao tratamento com prednisolona apresentou um grande aumento de expressão de Pgp e que o tratamento com imunossupressores foi capaz de controlar a doença nestes pacientes, que apresentaram, em paralelo, uma redução de expressão de Pgp em seus linfócitos.

Visto que há pouca informação disponível sobre os polimorfismos de *MDR1* em doenças autoimunes, analisamos os polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T em uma amostra de pacientes com lupus eritematoso sistêmico. Um grupo composto por brasileiros descendentes de europeus também foi analisado, pois não havia dados na literatura para estes polimorfismos referentes a amostras de controles para a população brasileira, nem mesmo para outras populações latino-americanas.

A comparação das frequências alélicas observadas na amostra controle com as observadas em populações da Europa mostraram que não há diferenças para as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo C1236T. Para o polimorfismo G2677T/A, foi observada diferença estatística significativa apenas em comparação com a amostra da Turquia ($P=0,00016$). Já para o polimorfismo C3435T, foi observada diferença estatística significativa em comparação com uma das amostras da Alemanha ($P=0,011$), com a amostra de Portugal ($P=0,013$) e com a amostra da Turquia ($P=0,013$). Não foram encontradas diferenças significativas na comparação com os demais dados publicados para populações da Europa (listados anteriormente na Tabela 2). A amostra de pacientes com lupus inclui 35 indivíduos afrodescendentes, o que possibilitou uma análise das frequências dos polimorfismos de *MDR1* em relação à etnia. Dados da literatura sugerem que existe

diferença na distribuição alélica do polimorfismo C3435T de acordo com a etnia, sendo o alelo 3435C mais freqüente em Africanos e afrodescendentes. Apesar do número de pacientes afrodescendentes ser pequeno em nossa amostra, foi possível observar uma freqüência elevada do alelo 3435C em comparação com eurodescendentes.

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as freqüências alélicas e a distribuição genotípica dos três polimorfismos na amostra controle e na amostra de pacientes com lupus eritematoso sistêmico, sugerindo que estes polimorfismos não são fatores importantes na susceptibilidade a esta doença. Este resultado está de acordo com o descrito por Pawlik *et al.* (2004) para artrite reumatóide. Estes autores analisaram o polimorfismo C3435T em pacientes com artrite reumatóide e não observaram diferenças genotípicas em relação ao grupo controle. No entanto, observaram que pacientes com o genótipo 3435TT tinham uma probabilidade de remissão após o tratamento com metotrexato e glicocorticóides quase três vezes maior que os demais. Os resultados obtidos até o momento parecem sugerir que não existe influência dos polimorfismos de *MDR1* na susceptibilidade a doenças autoimunes. No entanto, a análise de outras doenças autoimunes é essencial, visto que cada uma é caracterizada por um conjunto diferente de sintomas.

A análise das características clínicas dos pacientes com lupus sugere que não há influência dos polimorfismos de *MDR1* no desenvolvimento de artrite, úlceras orais, problemas renais ou problemas neurológicos em pacientes com lupus. No entanto, foram observadas diferenças nas freqüências alélicas do polimorfismo G2677T/A em pacientes que desenvolveram eritema malar e pleurite. Como foi descrito no manuscrito, a freqüência do alelo 2677A se mostrou reduzida no grupo de pacientes com eritema malar. Já no grupo de pacientes que desenvolveram pleurite, o alelo 2677A e o genótipo 2677TA foram observados em freqüências estatisticamente significativamente maiores que no grupo de

pacientes que não apresentaram essa característica. Estes dados são interessantes, pois estas características clínicas resultam de respostas imunológicas contrastantes: o eritema malar é uma reação de hipersensibilidade (reação alérgica) mediada por resposta do tipo Th2 enquanto a pleurite é uma reação inflamatória mediada por resposta imune do tipo Th1. Alguns trabalhos já sugeriram importância da Pgp em processos imunológicos. Randolph *et al.* (1998) sugeriram que inibidores da Pgp inibiriam também a migração de células dendríticas e é sabido que há expressão da Pgp em células do sistema imunológico, como células NK e linfócitos T citotóxicos (Klimecki *et al.*, 1994). Além disso, algumas citocinas, como IL-2, IL-4 e INF- γ , são substratos reconhecidos da Pgp (Parck *et al.*, 1998 e Drach *et al.*, 1996) e já foi observado que citocinas inflamatórias parecem ser capazes de causar um aumento na expressão de mRNA de *MDR1* (Bertilsson *et al.*, 2001). No entanto, não há dados sobre a influência dos polimorfismos de *MDR1* em processos imunológicos. Estes dados, em conjunto com os dados obtidos em nosso trabalho, mostram que pode ser interessante analisar a influência destes polimorfismos na resposta imunológica.

Há poucos dados disponíveis sobre a influência do polimorfismo G2677T/A em características clínicas para comparação com nossos resultados. Até o momento, foram relatadas apenas ausência de envolvimento deste polimorfismo na susceptibilidade ao Mal de Parkinson (Furuno *et al.*, 2002), relação entre o genótipo 2677TT e maior sobrevida em leucemia mielóide aguda (Illmer *et al.*, 2002) e menor tempo em tratamento com esteróides após transplante cardíaco em pacientes com genótipo 2677TT (Zheng *et al.*, 2002). Estes dois últimos trabalhos sugerem que o genótipo 2677TT esteja relacionado a uma maior disponibilidade dos fármacos utilizados em cada caso. É interessante observar que apenas o trabalho de Furuno *et al.*, entre os três últimos mencionados, avaliou a presença do alelo 2677A. Embora os resultados obtidos em nosso trabalho para os pacientes que

desenvolveram pleurite sejam limitados pelo tamanho amostral (na amostra de 137 pacientes, apenas 34 desenvolveram a característica), parece ser interessante analisar o efeito dos polimorfismos de *MDRI* não apenas na susceptibilidade a doenças e na resposta a tratamento, mas também no desenvolvimento de diferentes complicações que, em combinação, caracterizam a doença.

Foi observado desequilíbrio de ligação entre os três locos ($P < 0,00001$) em ambas as amostras, sendo os haplótipos mais frequentes 1236C-2677G-3435C e 1236T-2677T-3435T. A distribuição dos haplótipos foi calculada e não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e controles e entre os grupos de pacientes que apresentaram ou não as características clínicas analisadas. A maioria dos trabalhos publicados até o momento para polimorfismos de *MDRI* não apresenta este tipo de análise, mas, visto que a relação entre cada um dos polimorfismos e dados moleculares (e mesmo dados farmacocinéticos ou de relação com doenças) é bastante controversa, tem sido muito enfatizada a importância da análise de haplótipos.

Nossos dados sugerem, então, que os polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T do gene *MDRI* não estão relacionados com a susceptibilidade ao lupus eritematoso sistêmico. Os resultados obtidos com relação ao alelo 2677A indicam que é interessante avaliar o papel destes polimorfismos nos processos imunológicos e que a análise destes polimorfismos em doenças complexas deve considerar também características clínicas isoladas. Além disso, foram apresentados dados sobre as frequências genótípicas e alélicas destes polimorfismos em indivíduos brasileiros descendentes de europeus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE & Weiss J (2005) Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochem Pharmacol* 70:949-958.
- Ambudkar SV, Lelong IH & Zhang J (1992) Partial purification and reconstitution of the human multidrug resistance pump: characterization of the drug stimuable ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8472-8476.
- Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA & McLeod HL (2001) MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 11:217-221.
- Anglicheau D, Flamant M, Schlageter MH, Martinez F, Cassinat B, Beaune P, Legendre C & Thervet E (2003) Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus after renal transplantation *Nephro. Dial Transplant* 18:2409-2414.
- Atkinson DE, Greenwood SL, Sibley CP, Glazier JD & Fairbairn LJ (2003) Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C584-C591.
- Balram C, Sharma A, Sivathasan C & Lee EJ (2003) Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic-genotypic correlates. *Br J Clin Pharmacol* 56:78-83.
- Bernal ML, Sinues B, Fanlo A & Mayayo E (2003) Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population. *Ther Drug Monit* 25:107-111.
- Bertilsson PM, Olsson P & Magnusson KE (2001) Cytokines influence mRNA expression of cytochrome P450 3A4 and MDRI in intestinal cells. *J Pharm Sci* 90:638-646.
- Bleiber G, May M, Suarez C, Martinez R, Marzolini C, Egger M & Telenti A; Swiss HIV Cohort Study (2004) MDR1 genetic polymorphism does not modify either cell permissiveness to HIV-1 or disease progression before treatment. *J Infect Dis* 189:583-586.
- Bodor M, Kelly EJ & Ho RJ (2005) Characterization of the human MDR1 gene. *Ho AAPS J* 7:E1-E5.
- Bonhomme-Faivre L, Devocelle A, Saliba F, Chatled S, Maccario J, Farinotti R, & Picard V (2004) MDR-1 C3435T polymorphism influences cyclosporine a dose requirement in liver-transplant recipients. *Transplantation* 78:21-25.

- Brinkmann U (2002) Functional polymorphisms of the human multidrug resistance (MDR1) gene: correlation with P glycoprotein expression and activity in vivo. *Novartis Found Symp* 243:207-210.
- Brumme Z, Dong WWY, Chan KJ, Hogg RS, Montaner JSG, O'shaughnessy MV & Harrigan PR (2003) Influence of polymorphisms within the CX3CR1 and MDR1 genes on initial antiretroviral therapy response. *AIDS* 17:201-208.
- Calado RT, Franco RF, Zago MA & Falcao RP (2002) MDR1 gene C3435T polymorphism and the risk of acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol* 117:769-770.
- Callen DF, Baker E, Simmers RN, Seshadri R & Roninson IB (1987) Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. *Hum Genet* 77:142-144.
- Cascorbi I, Gerlogg 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* 69:169-174.
- Chaudhary PM, Mechetner EB & Roninson IB (1992) Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 80:2735-2739.
- Chelule PK, Gordon M, Palanee T, Page T, Mosam A, Coovadia HM & Cassol S (2003) MDR1 and CYP3A4 polymorphisms among African, Indian, and white populations in KwaZulu-Natal, South Africa. *Clin Pharmacol Ther* 74:195-196.
- Chen C, Clarck D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM & Roninson IB (1990) Genomic organization of the multidrug resistance (MDR1) gene and the origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem* 265:506-514.
- Chowbay B, Cumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q & Lee EJ (2003) Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics* 13:89-95.
- Dean M, Rzhetsky A & Allikmets R (2001a) The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily *Genome Res* 11:1156-1166.
- Dean M, Hamon Y & Chimini G (2001b) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily *J. Lipid Res* 42:1007-1017.
- Dey S (2006) Single nucleotide polymorphisms in human P-glycoprotein: its impact on drug delivery and disposition. *Expert Opin Drug Deliv* 3:23-35.
- Díaz-Borjon A, Richaund-Patin Y, Alvarado De La Barrera C, Jakez-Ocampo J, Ruiz-Arguelles A & Llorente L (2000) Multidrug resistance-I (MDR-I) 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* 67:40-48.
- 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* 88:1747-1754.

- Drescher S, Schaeffeler E, Hitzl M, Hofmann U, Schwab M, Brinkmann U, Eichelbaum M & Fromm MF (2002) MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine. *Br J Clin Pharmacol* 53:526-534.
- Drozdik M, Bialecka M, Mysliwiec K, Honczarenko K, Stankiewicz J & Sych Z. (2003) Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 13:259-263.
- Edwards, CJ (2005) Environmental factors and lupus: are we looking too late? *Lupus* 14:423-425.
- Endicott JA & Ling V (1989) The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 58:137-171.
- Efferth T, Sauerbrey A, Steinbach D, Gebhart E, Drexler HG, Miyachi H, Chitambar CR, Becker CM, Zintl F & Humeny A (2003) Analysis of single nucleotide polymorphism C3435T of the multidrug resistance gene MDR1 in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol* 23:509-517.
- Eichelbaum M, Fromm MF & Schwab M (2004) Clinical aspects of the MDR1 (ABCB1) gene polymorphism. *Ther Drug Monit* 26:180-185.
- Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB, Telenti A & Swiss HIV Cohort Study (2002) Response to antiretroviral treatment in HIV-1 infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet*. 359:30-36.
- Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC & Hutz MH (2005) The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther* 78:551-558.
- Fischer V, Einolf HJ & Cohen D (2005) Efflux transporters and their clinical relevance. *Mini Rev Med Chem* 5:183-195.
- Fromm MF (2002) The influence of MDR1 polymorphisms on p-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1295-1310.
- Furuno T, Landi MT, Ceroni M, Caporaso N, Bernucci I, Nappi G, Martignoni E, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Schwab M & Zanger UM (2002) Expression polymorphism of the blood-barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 12:529-534.
- Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmoller J, Frotschl R, Kopke K, Gerloff T, Chernov JN & Roots I (2003). Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1 NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol* 59:303-312.
- Gerloff T, Schaefer M, Johne A, Oselin K, Meisel C, Cascorbi I & Roots I (2002) MDR1 genotypes do not influence the absorption of a single oral dose of 1 mg digoxin in healthy white males. *Br J Clin Pharmacol* 54:610-616.
- Goh BC, Lee SC, Wang LZ, Fan L, Guo JY, Lamba J, Schuetz E, Lim R, Lim HL, Ong AB & Lee HS (2002) Explaining Interindividual Variability of Docetaxel

- Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Asians Through Phenotyping and Genotyping Strategies. *J Clin Oncol* 20:3683-3690.
- Goto M, Masuda S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K & Inui K (2002) C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 12:451-457.
- Gottesman MM, Fojo T & Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2:48-58.
- Gottesman MM & Pastan I (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62:386-427.]
- Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann UA & Pastan I (1995) Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu Rev Genet* 29:607-49.
- Gudmundsson S & Steinsson K (1990) Systemic lupus erythematosus in Iceland 1975 through 1984. A nationwide epidemiological study in an unselected population. *J Rheumatol* 17:1162-1167.
- Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaeffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M & Fromm MF (2001) 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* 11:293-298.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmüller J, Johne 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* 97:3473-3478.
- Horinouchi M, Sakaeda T, Nakamura T, Morita Y, Tamura T, Aoyama N, Kasuga M & Okumura K (2002) Significant genetic linkage of MDR1 polymorphisms at positions 3435 and 2677: functional relevance to pharmacokinetics of digoxin. *Pharm Res* 19:1581-1585.
- Ieiri I, Takane H & Otsubo K (2004) The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 43:553-576.
- Ifergan I, Bernard NF, Bruneau J, Alary M, Tsoukas CM & Roger M (2002) Allele frequency of three functionally active polymorphisms of the MDR-1 gene in high-risk HIV-negative and HIV-positive Caucasians. *AIDS* 16:2340-2342.
- Illmer T, Schuler US, Thiede C, Schwartz UI, Kim RB, Gotthard S, Freund D, Schäkel G & Schaich M (2002) MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res* 62:4955-4962.
- Jamroziak K, Młynarski W, Balcerczak E, Mistygacz M, Trelinska J, Mirowski M, Bodalski J & Robak T (2004) Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol* 72:314-321.
- Johne A, Kopke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C, Hoffmeyer S, Kerb R, Fromm MF, Brinkmann U, Eichelbaum M, Brockmoller J, Cascorbi I & Roots I (2002)

- Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clin Pharmacol Ther* 72:584-594.
- Juliano RL & Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cells mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152-162.
- Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreinberg R, Zeillinger R & Deissler H (2003) Polymorphism C3435T of the MDR1 gene predicts response to preoperative chemotherapy on locally advanced breast cancer. *Int J Oncol* 22:1117-1121.
- Kaya, P, Günduz U, Arpacı F, Ural AU & Guran S (2005) Identification of polymorphisms on the MDR1 gene among Turkish population and their effects on multidrug resistance in acute leukemia patients. *Am J Hematol* 80:26-34.
- Kerb R, Hoffmeyer S & Brinkmann U (2001) ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* 2:51-64.
- Kessel D, Botterill V & Wodinski I (1968) Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. *Cancer Res* 28:938-941.
- Kessel D, Hall TC, Roberts D & Wodinsky I (1965) Uptake as a determinant of the methotrexate response in mouse leukemia. *Science* 150:752-754.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwartz UI, Taylor A, Xie H, Mckinsey J, Zhou S, Lan L, Schuetz JD, Schuetz EG & Wilkinson GR (2001) Identification of functionally variant *MDR1* alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 70:189-199.
- Kishi S, Yang W, Boureau B, Morand S, Das S, Chen P, Cook EH, Rosner GL, Schuetz E, Pui C & Relling MV. (2004) Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103:67-72.
- Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM & Dalton WS (1994) P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* 83:2451-2458.
- Kruh DG & Belinsky MG (2003) The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 22:7537-7552.
- Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, Morita T, Irie S, Urae A, Ohdo S, Ohtani H, Sawada Y, Higuchi S & Otsubo K (2002) Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 72:209-219.
- Kusuhara H, Suzuki H, Naito M, Tsuruo T & Sugiyama Y (1998) Characterization of Efflux Transport of Organic Anions in a Mouse Brain Capillary Endothelial Cell Line. *J Pharmacol Exp Ther* 285:1260-1265.
- Lee CGL, Tang K, Cheung YB, Wong LP, Tan C, Shen H, Zhao Y, Pavanni R, Lee EJD, Wong MC, Chong SS & Tan EK (2004) *MDR1*, the blood-brain barrier transporter, is associated with Parkinson's disease in ethnic Chinese. *J Med Genet* 41:e60 (<http://www.jmedgenet.com/cgi/content/full/41/5/e60>).

- Leslie EM, Deeley RG & Cole SPC (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 204:216-237.
- Levy AS, Cunningham-Rundles S, Mazza B, Simm M, Gorlick R & Bussel J (2002) High P-glycoprotein-mediated export observed in patients with a history of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 118:836-838.
- Llorente L, Richaund-Patin Y, Díaz-Borjon A, Alvarado-de la Barrera C, Jakez-Ocampo J, de la Fuente H, Gonzalez-Amaro R & Díaz-Jouanen E (2000) Multidrug resistance-I (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part I: increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients might influence disease outcomes. *Joint Bone Spine* 67:30-39.
- Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A, Goldberg L & Holt DW (2005) Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 79:499-502.
- Mai I, Perloff ES, Bauer S, Goldammer M, Johne A, Filler G, Budde K & Roots I. (2004) MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 58:548-53.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T & Kim RB (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 75:13-33.
- Min DI & Ellingrod VL (2002) C3435T mutation in exon 26 of the human MDR1 gene and cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit* 24:400-404.
- Moriya Y, Nakamura T, Hourinouchi M, Sakaeda T, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Gotoh A, Fujimoto S, Matsuo M, Kasuga M & Okumura K (2002) Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese. *Biol Pharm Bull* 25:1356-1359.
- Nakajima M, Fujiki Y, Kyo S, Kanaya T, Nakamura M, Maida Y, Tanaka M, Inoue M & Yokoi T (2005) Pharmacokinetics of Paclitaxel in Ovarian Cancer Patients and Genetic Polymorphisms of CYP2C8, CYP3A4, and MDR1. *J Clin Pharmacol* 45:674-682.
- Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Matsuo M, Kasuga M & Okumura K (2002) Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 71:297-303.
- Nasi M, Borghi V, Pinti M, Bellodi C, Lugli E, Maffei S, Troiano L, Richeldi L, Mussini C, Esposito R & Cossarizza A (2003) MDR1 C3435T genetic polymorphism does not influence the response to antiretroviral therapy in drug-naive HIV-positive patients. *AIDS* 17:1696-1698.
- Okamura N, Sakaeda T & Okumura K (2004) Pharmacogenomics of MDR and MRP subfamilies. *Personalized Med* 1:85-104.
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>

- O'Neill SG & Schrieber L (2005) Immunotherapy of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 4:395-402.
- Oselin K, Gerloff T, Mrozikiewicz PM, Pahkla R & Roots I (2003) MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes. *Fundam Clin Pharmacol* 17:463-469.
- Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK & Pirmohamed M (2005) Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. *Br J Clin Pharmacol* 59:365-370.
- Panwala CM, Jones JC & Viney JL (1998) A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol* 161:5733-5744.
- Park SW, Lomri N, Simeoni LA, Fruehauf JP & Mechetner E (2003) Analysis of P-glycoprotein-mediated membrane transport in human peripheral blood lymphocytes using the UIC2 shift assay. *Cytometry A* 53:67-78.
- Parks CG & Cooper GS (2005) Occupational exposures and risk of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 38:497-506.
- Pawlik A, Wrzesniewska J, Fiedorowick-Fabrycy I & Gawronska-Szklarz B (2004) The MDR1 3435 polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 42:496-503.
- Pauli-Magnus C, Feiner J, Brett C, Lin E & Kroetz DL (2003) No effect of MDR1 C3435T variant on loperamide disposition and central nervous system effects. *Clin Pharmacol Ther* 74:487-498.
- Petri M (2005) Review of classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin N Am* 31:245-254.
- Plasschaert SL, Groninger E, Boezen M, Kema I, de Vries EG, Uges D, Veerman AJ, Kamps, WA, Vellenga E, de Graaf SS & de Bont ES (2004) Influence of functional polymorphisms of the MDR1 gene on vincristine pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 76:220-229.
- Prokunina L & Alarcon-Riquelme M (2004) The genetic basis of systemic lupus erythematosus – knowledge of today and thoughts for tomorrow. *Hum Mol Genet* 13:R143-R148.
- Putnam WS, Woo JM, Huang Y & Benet LZ (2005) Effect of the *MDR1* C3435T Variant and P-Glycoprotein Induction on Dicloxacillin Pharmacokinetics. *J Clin Pharmacol* 45:411-421.
- Randolph GJ, Beaulieu S, Pope M, Sugawara I, Hoffman L, Steinman RM & Muller WA (1998) A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6924-6929.
- Richaud-Patin Y, Soto-Veja E, Jakez-Campos J & Llorente L (2004a) P-glycoprotein in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 3:188-192.

- Richaud-Patin Y, Vega-Boada F, Vidaller A & Llorente L (2004b) Multidrug resistance-1 (MDR-1) in autoimmune disorders IV. P-glycoprotein overfunction in lymphocytes from myasthenia gravis patients. *Biomed Pharmacother* 58:320-324.
- Riemekasten G & Hahn BH (2005) Key autoantigens in SLE. *Rheumatology* 44:975-982.
- Roberts R, Joyce P, Mulder RT, Begg EJ & Kennedy MA (2002) A common P-glycoprotein polymorphism is associated with nortriptyline-induced postural hypertension in patients treated for major depression. *Pharmacogenomics J* 2:191-196.
- Rodrigues AC, Rebecchi IMM, Bertolami MC, Faludi AA, Hirata MH & Hirata RDC (2005) High baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with *MDR1* haplotypes in Brazilian hypercholesterolemic individuals of European descent. genetic polymorphism and lipids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38:1389-1397
- Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC & Higgins CF (1997) Structure of the Multidrug Resistance P-glycoprotein to 2.5nm Resolution Determined by Electron Microscopy and Image Analysis. *J Biol Chem* 272:10685-10694.
- Ruiz-Soto R, Richaud-Patin Y, López-Karpovitch X & Llorente L (2003) Multidrug resistance-1 (MDR-1) in autoimmune disorders III: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from immune thrombocytopenic purpura patients. *Exp Hematol* 31:483-487.
- Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T, Morita Y, Tamura T, Aoyama N, Hirai M, Kasuga M & Okumura K (2001) MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 18:1400-1404.
- Sakaeda T, Nakamura T & Okumura K (2004) Pharmacogenetics of drug transporters and its impact on the pharmacotherapy. *Curr Top Med Chem* 4:1385-1398.
- Sakaeda T, Nakamura T & Okumura K (2002) MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Biol Pharm Bull* 25:1391-1400.
- Sato EI, Bonfá ED, Costallat LTL, Silva NA, Brenol JCT, Santiago MB, Szajubok JCM, Filho AR, Barros RT & Vasconcelos M (2002) Consenso brasileiro para o tratamento de lúpus eritematoso sistêmico (LES). *Rev Bras Reumatol* 42:362-370.
- Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S & Schwab M (2001) Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *The Lancet* 358:383-384.
- Scheffer GL, Pijnenborg AC, Smit EF, Muller M, Postma DS, Timens W, van der Valk P, de Vries EGE & Scheper RJ (2002) Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *J Clin Pathol* 55:332-339.
- Schiengold M, Schwantes L, Schwartsmann G, Chies JAB & Nardi NB (2001) Multidrug resistance gene expression during the murine ontogeny. *Mech Ageing Dev* 122:255-270.
- Schwab M, Eichelbaum M & Fromm MF (2003a) Genetic polymorphisms of the human *MDR1* drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:285-307.

- Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M, Walker S, Cascorbi I, Roots I, Brinkmann U, Zanger UM & Eichelbaum M (2003b) Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124:26-33.
- Shustik C, Dalton W & Gros P (1995) P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells – biochemistry, clinical relevance and modulation. *Mol Aspects Med* 16:1-18.
- Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB, Wood NW & Sisodiya SM (2003) Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med* 348:1442-1448.
- Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B, Warzok R, Kroemer HK & Cascorbi I (2002) The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther* 72:572-583.
- Siegmund M, Brinkmann U, Schäffeler E, Weirich G, Schawb M, Eichelbaum M, Fritz P, Burk O, Decker J, Alken P, Rothenpieler U, Kerb R, Hohmeyer S & Brauch H (2002) Association of the P-Glycoprotein transporter *MDR1*^{C3435T} polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol* 13:1847-1854.
- Tada H, Tsuchiya N, Satoh S, Kagaya H, Li Z, Sato K, Miura M, Suzuki T, Kato T & Habuchi T (2005) Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 37:1730-1732.
- Tan EK, Drozdik M, Bialecka M, Honczarenko K, Klodowska-Duda G, Teo YY, Tang K, Wong LP, Chong SS, Tan C, Yew K, Zhao Y & Lee CG (2004) Analysis of MDR1 haplotypes in Parkinson's disease in a white population. *Neurosci Lett* 372:240-244.
- Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N & Otsubo K (2001) Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 297:1137-1143.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I & Willingham MC (1987) Cellular localization of the multidrugresistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7735-7738.
- Thörn M, Finnstrom N, Lundgren S, Rane A & Loof L (2005) Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *Br J Clin Pharmacol* 60:54-60.
- Tsao, BP (2004) Update on human systemic lupus erythematosus genetics. *Curr Opin Rheumatol* 16:513-521.
- 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* 52:1676-1683.
- van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel, AH, Borst P & van Meer G (1996) MDR1 P-Glycoprotein Is a Lipid Translocase of Broad Specificity, While

- MDR3 P-Glycoprotein Specifically Translocates Phosphatidylcholine. *Cell* 87:507-517.
- Vasoo, S & Hughes, GRV (2005) Theory, targets and therapy in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 14:181-188.
- Verstuyft C, Schwab M, Schaeffeler E, Kerb R, Brinkmann U, Jaillon P, Funck-Brentano C & Becquemont L (2003) Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol* 58:809-812.
- von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M & Armstrong VW (2001) No Influence of the *MDR-1* C3435T Polymorphism or a *CYP3A4* Promoter Polymorphism (*CYP3A4-V* Allele) on Dose-adjusted Cyclosporin A Trough Concentrations or Rejection Incidence in Stable Renal Transplant Recipients. *Clin Chem* 47:1048-1052.
- Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL & Sadée W (2005) Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 15:693-704.
- Watkins PB (1997) The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv Drug Deliv Rev* 27:161-170.
- Wong M, Evans S, Rivory LP, Hoskins JM, Mann GJ, Farlow D, Clarke CL, Balleine RL & Gurney H (2005) Hepatic technetium Tc 99m-labeled sestamibi elimination rate and ABCB1 (MDR1) genotype as indicators of ABCB1 (P-glycoprotein) activity in patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther* 77:33-42.
- Yamauchi A, Ieiri I, Kataoka Y, Tanabe M, Nishizaki T, Oishi R, Higuchi S, Otsubo K & Sugimachi K (2002) Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation* 74:571-572.
- Yates CR, Zhang W, Song P, Li S, Gaber AO, Kotb M, Honaker MR, Alloway RR & Meibohm B (2003) The Effect of CYP3A5 and MDR1 Polymorphic Expression on Cyclosporine Oral Disposition in Renal Transplant Patients. *J Clin Pharmacol* 43:555-564.
- Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Lamba J, Bowman P & Buckart G J (2002) The *MDR1* polymorphisms at exons 21 and 26 predict steroid weaning in pediatric heart transplant patients. *Hum Immunol* 63:765-770.

ANEXO: DATALHAMENTO DOS MÉTODOS

Para a determinação dos genótipos de cada indivíduo foi utilizada a técnica de PCR-RFLP. A seguir, serão descritas informações detalhadas sobre a genotipagem de cada um dos polimorfismos de *MDR1* analisados. Todas as reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µl contendo 0,4 µM de cada primer, 3 mM de MgCl₂, 400 µM de DNTP, 1,25 U de Taq Polimerase e tampão 10X. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% com utilização de um marcador de peso molecular.

C1236T

A amplificação de um fragmento de 366 pb (incluindo parte do exon 12 e parte do intron 12) foi obtida por PCR com os primers *forward* 5' TAT CCT GTG TCT GTG AAT TGC C 3' e *reverse* 5' CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG 3'. O programa de amplificação utilizado foi de 3 min a 94°C seguidos de 37 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C e 1 min a 72°C, finalizando com 3 min a 72°C. Após confirmação da amplificação, um volume de 12 µl foi encubado a 37°C com 4 U de *HaeIII over-night*. Os fragmentos resultantes foram visualizados em gel de agarose 3% ou gel de acrilamida 8%. O padrão de bandas obtido e a identificação dos genótipos estão representados na Figura 2. Não foi possível obter uma foto com qualidade para reprodução.

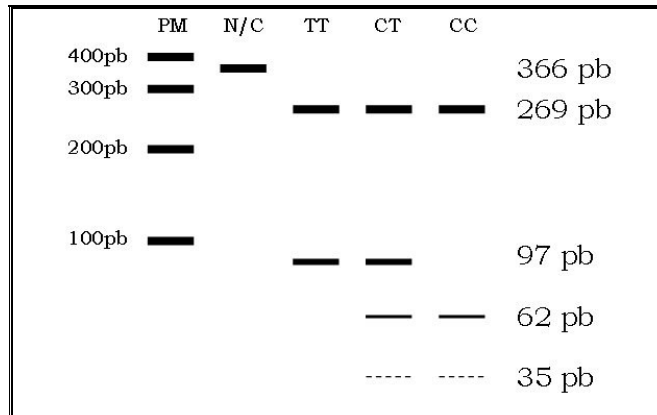


Figura 2. Representação do padrão de bandas da genotipagem do polimorfismo C1236T. PM = Padrão de peso molecular, N/C = produto de PCR não clivado.

G2677T/A

A genotipagem deste polimorfismo foi feita em duas etapas: na primeira, obteve-se confirmação dos indivíduos que apresentavam o alelo T e, na segunda, obteve-se a confirmação dos indivíduos que apresentavam o alelo A. Indivíduos identificados como homozigotos TT na primeira etapa não foram submetidos à segunda etapa.

Na identificação do alelo T, foram utilizados os primers *foward* 5' TGC AGG CTA TAG GTT CCA GG 3' e *reverse* 5' TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC G 3' para amplificação de um fragmento de 224 pb, incluindo parte do exon 21 e o início do intron 21. O programa de amplificação foi o mesmo utilizado para a genotipagem do polimorfismo C1236T. Após confirmação da amplificação, um volume de 12 µl foi submetido à digestão com 1 U de *BanI* a 37°C *over-night*. A Figura 3 mostra o padrão de bandas obtidos e a identificação dos genótipos em gel de agarose 3%.

Na identificação do alelo A, foi utilizado o mesmo primer *foward* da identificação do alelo T combinado com o primer *reverse* 5' GTT TGA CTC ACC TTC CCA G 3'. O produto de amplificação inclui parte do exon 21 e o início do intron 21, totalizando 220 pb. O programa de amplificação só diferiu do utilizado para a genotipagem do polimorfismo

C1236T pela etapa de anelamento de primers ocorrer a 62°C. Após confirmação da amplificação, um volume de 12 µl foi incubado a 65°C por 3 horas com 1 U de *Bse*NI. A visualização dos fragmentos foi feita em gel de acrilamida 8% e o padrão de bandas obtido e a identificação dos genótipos é mostrado na Figura 4.

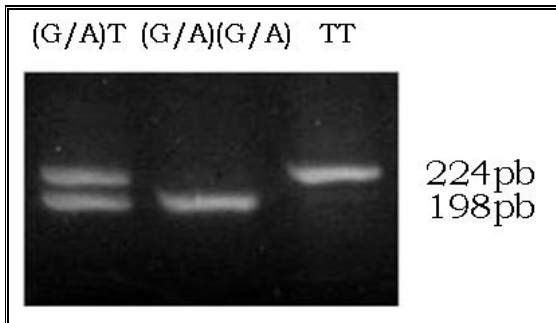


Figura 3. Foto mostrando o padrão de bandas da primeira etapa da genotipagem do polimorfismo G2677T/A. Um fragmento de 26 pb em (G/A)T e (G/A)(G/A) não é visualizado.

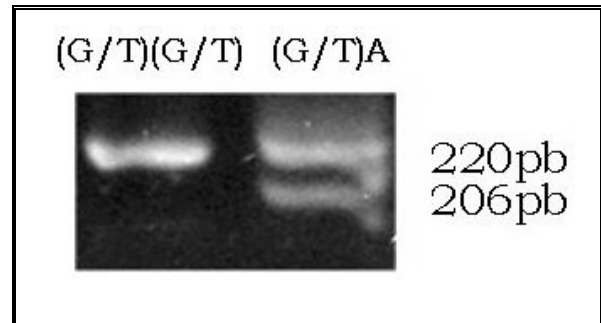


Figura 4. Foto mostrando o padrão de bandas da segunda etapa da genotipagem do polimorfismo G2677T/A. Um fragmento de 14 pb em (G/T)A não é visualizado. Não foram encontrados homocigotos AA.

C3435T

Um fragmento de 201 pb (incluindo parte do intron 25 e parte do exon 26) foi obtido por amplificação por PCR com os primers *forward* 5'. CAA AGA AAT AAA GCG ACT GAA TG 3' e *reverse* 5' TTA TTA GGC AGT GAC TCG ATG AA 3'. O programa de amplificação foi o mesmo utilizado para a genotipagem do polimorfismo C1236T. Um volume de 12 µl, após confirmação da amplificação, foi incubado a 25°C por 3 horas com 1 U de *Sau*3AI. O padrão de bandas obtido e a identificação dos genótipos são mostrados na Figura 5, e a visualização foi feita em gel de agarose 2,5%.

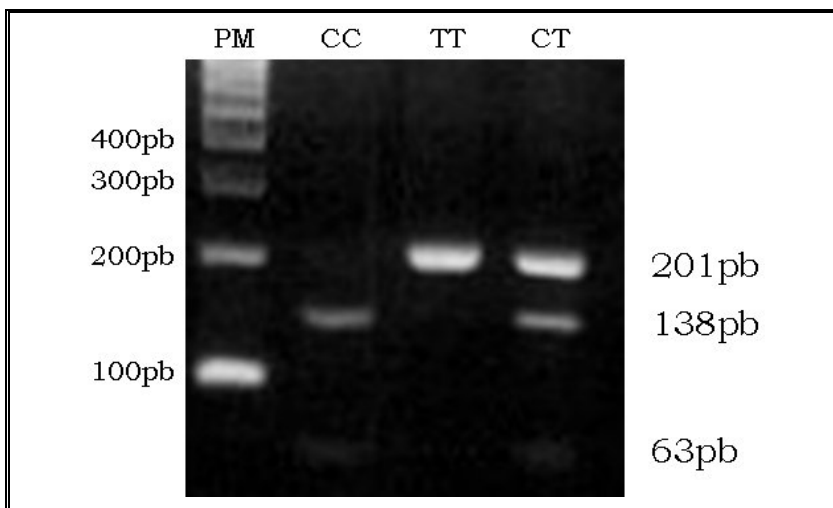


Figura 5. Foto mostrando o padrão de bandas da genotipagem do polimorfismo C3435T. PM = Padrão de peso molecular.