

FUNCIONALIDAD DE LA GLICOPROTEINA P LINFOCITARIA EN LA COLITIS ULCEROSA*

CATALINA M. CORTADA¹, ANIBAL GIL³, SILVINA GONCALVES³,
ALICIA SAMBUELLI³, MODESTO C. RUBIO², MARTA A. CARBALLO¹

¹CIGETOX, Citogenética Humana y Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica Clínica, ²Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, ³Sección Enfermedades Inflammatorias Intestinales, Hospital de Gastroenterología Dr. Carlos Bonorino Udaondo, Buenos Aires

Resumen La glicoproteína gp-P, codificada por el MDR1 es una bomba de eflujo transmembrana capaz de movilizar una gran cantidad de fármacos de uso frecuente. Se expresa en la cara luminal del epitelio intestinal, en linfocitos y otros tejidos con función de barrera. MDR1 ha sido postulado como gen candidato en la colitis ulcerosa. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la función de la gp-P en linfocitos aislados de sangre periférica de pacientes con colitis en actividad (n = 27) clasificados clínicamente como refractarios (n=16) o respondedores (n = 11) al tratamiento. Se estudió el eflujo de rodamina 123, sustrato de la glicoproteína P, en ausencia y presencia del inhibidor verapamilo (100 µM) determinando la fluorescencia intracelular por citometría de flujo. Los resultados se expresaron evaluando el comportamiento de dos marcadores que corresponden al % de células que contienen máxima (M1)/mínima (M2) concentración del colorante, reflejando inactividad/actividad de la bomba. Utilizando el test de Kruskal-Wallis y post test de Dunn, se observaron diferencias significativas entre refractarios *versus* respondedores (p < 0.05) y *versus* controles sanos (n = 68) previamente estudiados (p < 0.01). Respondedores y controles sanos no mostraron diferencias (p > 0.05). Al mismo tiempo, se realizó el ensayo de eflujo en 12 pacientes que requirieron cambio de tratamiento, observándose una disminución significativa (p < 0.01) en el transporte de rodamina en ausencia de inhibidor una vez conseguida la mejoría clínica. En conclusión, los resultados sugieren un posible papel de la gp-P en la refractariedad y una posible utilidad de este método en la predicción de la respuesta individual al tratamiento farmacológico.

Palabras clave: ABCB1, ensayo de eflujo de Rh123, colitis ulcerosa

Abstract *P-glycoprotein functional activity in peripheral blood lymphocytes in ulcerative colitis.*

P-glycoprotein (P-gp), encoded by MDR-1, is a transmembrane efflux pump that has been involved in relevant clinical drug transport. It is expressed in lymphocytes, luminal epithelium of colon and other tissues with barrier function. MDR1 was proposed as a candidate gene for ulcerative colitis. The aim of the present work was to investigate the role of P-gp in therapeutic response of ulcerative colitis by studying its functionality in lymphocytes isolated from peripheral blood. Samples were taken from 27 patients with active colitis classified clinically in refractory (n = 16) and responders (n = 11) to treatment. Rhodamine 123 (a fluorescent P-glycoprotein substrate) efflux was studied by flow cytometry as absence and presence of an inhibitor (verapamil, 100 µM). Data were expressed evaluating the behaviour of two markers defined based on % of cells with maximum (M1)/minimum (M2) intracellular fluorescence, reflecting inactivity/activity of the pump. Results were compared with a group of healthy individuals (n = 68). Significant differences were observed in absence and presence of Verapamil inhibition, when comparing refractory vs. responders (p < 0.05) as well as refractory vs. healthy controls (p < 0.01). No differences were observed when comparing responders vs. controls (p > 0.05) (Kruskal-Wallis test and Dunn post-test). Rhodamine efflux assay was also performed in 12 patients who required therapeutic change; a significant diminish of rhodamine transport (p < 0.01) was observed without inhibitor when patients achieved clinical response. Finally, our results suggest a possible relevant role of P-gp in ulcerative colitis treatment response and a possible usefulness of P-gp functional assay in the early detection of individual therapeutic response.

Key words: ABCB1, Rh123 efflux assay, ulcerative colitis

Dirección postal: Bioq. Catalina M. Cortada, CIGETOX, Citogenética Humana y Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina

Fax: (54-11)5950-8707/8691

e-mail: eldecata@yahoo.com.ar

* Este trabajo ha sido distinguido con el premio Patricio Cossio en la reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, noviembre de 2008

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria intestinal (EII) crónica de etiología desconocida que se manifiesta con una activación exacerbada del sistema inmunitario de la mucosa intestinal, en la que frecuentemente se observan manifestaciones autoinmunes. Se postula que la enfermedad se desarrolla en sujetos genéticamente predispuestos, con la interacción de factores exógenos o ambientales (como agentes infecciosos, la flora luminal intestinal normal) y del huésped siendo crucial la función de barrera del epitelio intestinal, pudiendo influir otras variables como factores vasculares, actividad neuronal, etc. Como resultado de esta multiplicidad de componentes, se desencadena un estado crónico de desregulación de la función inmunitaria de la mucosa frente a antígenos intraluminales, favoreciendo aún más su manifestación diversos factores del entorno (i.e. tabaquismo)¹. La EII es una enfermedad poligénica, habiéndose demostrado mediante metaanálisis que la región genómica donde se encuentra el gen MDR1 (*multidrug resistance 1*) estaría asociada a la susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad.

El gen MDR1 codifica para la glicoproteína P (gp-P) (*P* proveniente de *permeabilidad*) que forma parte de la familia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Dicha proteína se ubica en la membrana plasmática donde funciona como una bomba de eflujo transportando sustratos desde el intracelular, o desde la membrana plasmática, hacia el extracelular obteniendo la energía de la hidrólisis de ATP². Su región transmembrana presenta una conformación semejante a un bolsillo hidrofóbico que le permite adaptarse a sustratos de gran diversidad estructural y de tamaño³. Sus sustratos endógenos son citoquinas (IL-2 y 4) y glucocorticoides (cortisol y aldosterona), mientras que dentro de los exógenos se han identificado gran cantidad de fármacos de uso habitual en la clínica médica, como ser antineoplásicos, glucósidos cardíacos, antibióticos, inmunosupresores, antirretrovirales, antiepilépticos, corticoides, etc.^{4, 5}.

En el organismo, la gp-P se expresa en el tracto gastrointestinal, hígado, riñón, cerebro, corazón y células de la línea hematopoyética, entre otros. Entre las funciones que se le atribuyen, participa en la absorción, metabolización y eliminación de xenobióticos⁶, congruente con su ubicación estratégica en la región apical de los epitelios de órganos con función absorbente y excretora. Su expresión en linfocitos y en epitelio intestinal es de particular interés ya que son sitios que se encuentran comprometidos en la CU siendo blancos de ataque en el tratamiento mediante el uso de fármacos inmunosupresores⁷, principalmente los glucocorticoides.

Farell y col. informaron que en pacientes que no respondieron a la farmacoterapia la expresión de gp-P se encuentra aumentada en linfocitos de sangre periférica, linfocitos de la lámina propia y células epiteliales de intestino, siendo la extrusión de los fármacos utilizados en

el tratamiento el mecanismo por el cual reducirían su eficacia al disminuir los niveles intracelulares de los mismos⁸. Sin embargo, estudios posteriores de otros autores que investigaron la función gp-P en la CU tanto en la respuesta al tratamiento como en la patogenia, resultaron controvertidos⁹⁻¹¹.

El objetivo del presente trabajo es describir la función de la gp-P en pacientes con CU activa, clasificados clínicamente como refractarios o respondedores al tratamiento farmacológico, a fin de determinar su posible participación en la patogenia de la enfermedad y en la respuesta terapéutica. Por otro lado, en pacientes que respondieron clínicamente al tratamiento se determinó la funcionalidad de la gp-P antes y después del cambio de tratamiento, a fin de determinar su asociación con la respuesta.

Pacientes estudiados: Se estudiaron 27 pacientes provenientes de la Sección Enfermedades Inflammatorias Intestinales del Hospital Udaondo con colitis ulcerosa en actividad, de los cuales 16 fueron clasificados clínicamente como refractarios (mujeres = 6, varones = 10, edad = 34 ± 14 años) y 11 como respondedores (n = 11, mujeres = 6, varones = 5, edad = 36 ± 18 años) al tratamiento farmacológico. Según la situación clínica, los refractarios a corticoides fueron posteriormente tratados con mercaptopurina y/o anticuerpos anti-TNF (infiximab). Ante la aparición de refractariedad a estos fármacos y/o la gravedad del cuadro clínico se indicó cirugía (colectomía). Se compararon los resultados con los de una población sana (n = 68, mujeres = 40, varones = 28, edad = 37 ± 14 años) previamente estudiada.

Paralelamente, se seleccionaron 12 pacientes (mujeres = 6, varones = 6), sin tratamiento previo o que requirieron cambio de tratamiento por falla terapéutica, a los cuales se les realizó la determinación en forma previa y posterior al cambio de tratamiento (entre una y cuatro semanas de la nueva terapia), realizando la toma de muestra en relación a la mejoría clínica del paciente.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Independiente del Hospital Dr. Carlos Bonorino Udaondo (CODEIHBU). En el caso de la población sana, el mismo fue aprobado por el Comité de Ética para Investigaciones Clínicas (CETIN).

Muestreo y aislamiento de células mononucleares: A cada paciente se le tomó una muestra de sangre periférica con jeringa heparinizada, en condiciones de esterilidad, la cual fue procesada dentro de las 24 h.

A partir de la muestra se aislaron las células mononucleares por medio de un gradiente de densidad según el método descrito por Bøyum¹². Se realizó el recuento en cámara de Neubauer con Azul Tripán, requiriéndose un 95% de viabilidad para realizar el ensayo.

Ensayo de eflujo de rodamina 123: Para el ensayo de eflujo de rodamina 123, 10^6 células aisladas se incubaron con 150 ng/ml ($0.39 \mu\text{M}$) del colorante por 10 min, a

temperatura ambiente en oscuridad. Se realizaron dos lavados con PBS frío y se incubó a 37 °C durante 3 h con RPMI 1640 libre de rodamina y 10% de SFB, en presencia y ausencia del inhibidor verapamilo (100 mM). Luego, se realizó un lavado con PBS y se conservó en hielo hasta la lectura. Finalmente, las células se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Calibur, Becton-Dickinson)^{13, 14} adquiriendo información sobre tamaño (FSC), granularidad (SSC) y fluorescencia intracelular de 10000 eventos. La región linfocítica se definió a partir de los parámetros físicos (granularidad y tamaño). Considerando los eventos seleccionados en esta región, se graficaron los histogramas de fluorescencia donde se definieron dos marcadores (M1 y M2) en base al nivel de fluorescencia intracelular que se observó. Estos corresponden al % de células¹⁵ que contienen máxima (M1)/mínima (M2) concentración del colorante, reflejando inactividad /actividad de gp-P.

El coeficiente de variación del ensayo fue determinado previamente, siendo del 13%.

Análisis estadístico: La evaluación estadística de los parámetros M1 y M2 se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis y post test de Dunn. Para evaluar el seguimiento del tratamiento se utilizó el test de Student de dos colas para la media con la corrección de Welch. Valores de p < 0.05 fueron considerados significativos.

El estudio de la funcionalidad de la gp-P se realizó mediante el ensayo de eflujo de rodamina 123. Los parámetros que se eligieron para evaluar la actividad de la gp-P fueron el % de células de alto (M1) y bajo (M2) nivel de fluorescencia. Considerando que, al inhibir la gp-P la rodamina permanece en el intracelular, el valor de fluorescencia intracelular es mayor en estado de inactividad de la bomba (M1); por el contrario, cuando la bomba está activa produce el eflujo de la rodamina, obteniéndose una menor fluorescencia intracelular que reflejaría la actividad de la bomba (M2). Los resultados de la variación de ambos parámetros se encuentran en la tabla A.

Por medio del test de Kruskal-Wallis y post test de Dunn, se determinó que existen diferencias estadística-

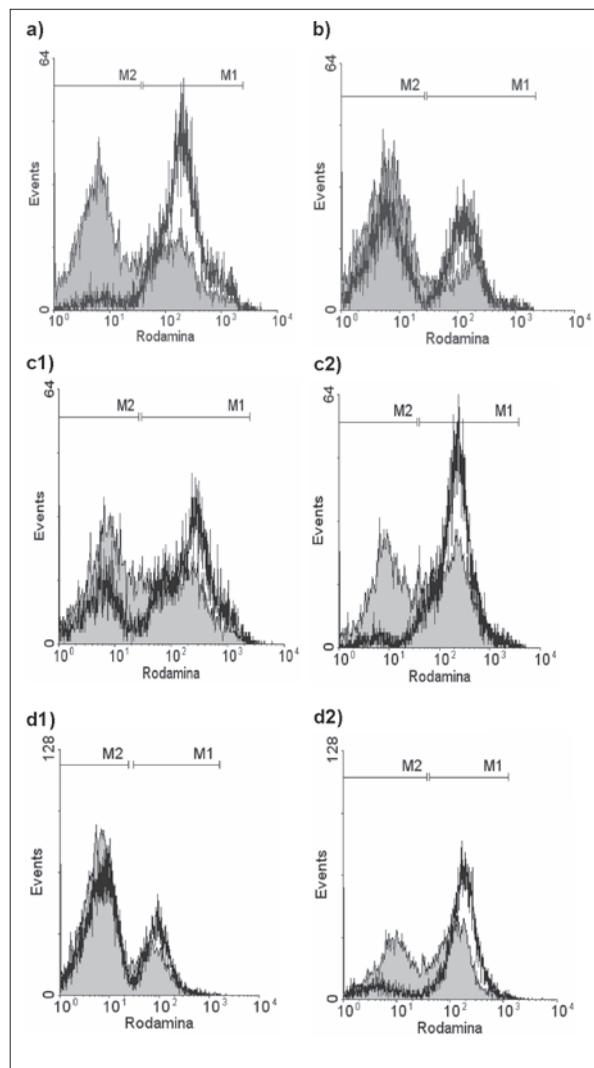


Fig. 1.– Histograma de la población linfocítica en función del contenido de rodamina 123. Linfocitos humanos incubados a 37 °C durante 3 hs sin (gris) y con verapamilo (100 mM) (negro), previa exposición a rodamina 123. (a) Respondedor, (b) refractario, (c) y (d) dos pacientes con CU activa antes (1) y después (2) de la mejoría clínica.

TABLA 1.– Porcentaje de células ($\bar{X} \pm DS$) de mayor (M1) y menor (M2) contenido de fluorescencia intracelular para linfocitos a 37 °C durante 3 h sin y con verapamilo (100 μ M), previa exposición a rodamina 123.

| | Sin Inhibidor | | Con inhibidor | |
|---------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| | M1 | M2 | M1 | M2 |
| Controles | 47 ± 12 | 50 ± 12 | 82 ± 8 | 14 ± 9 |
| Respondedores | 48 ± 10 ^{ns} | 49 ± 10 ^{ns} | 88 ± 6 ^{ns} | 10 ± 5 ^{ns} |
| Refractarios | 34 ± 13 ^{**} | 63 ± 14 ^{**} | 62 ± 22 ^{***} | 35 ± 22 ^{***} |

ns no significativo, **p<0.01, ***p<0.001

mente significativas para los parámetros M1 y M2 evaluados en los pacientes refractarios con respecto a los respondedores (sin inhibidor p < 0.05, con inhibidor p < 0.001), y a los sanos (sin inhibidor p < 0.01, con inhibidor p < 0.001); mientras que no existe diferencia significativa entre los pacientes respondedores y los individuos sanos (p > 0.05).

En la Fig. 1 se puede observar la variación del porcentaje de células de alta y baja fluorescencia. En el caso de un paciente respondedor (a), se observa que frente al agregado del inhibidor aumenta el porcentaje de células de alta fluorescencia, lo que indicaría una inhibición de la gp-P. Por el contrario, en un paciente refractario (b), es posible notar la persistencia de baja fluorescencia a pesar del agregado del inhibidor.

A fin de mejorar la especificidad del ensayo, se probó un segundo inhibidor, valsopodar (PSC 833) (1 μ M) con el cual se obtuvieron resultados semejantes.

En los pacientes a los cuales se les realizó el seguimiento luego del agregado de un nuevo fármaco, los resultados obtenidos fueron: antes del inicio del tratamiento: sin inhibidor: M1 = 41 ± 10 y M2 = 57 ± 11 , con inhibidor: M1 = 78 ± 18 y M2 = 20 ± 19 ; los valores obtenidos luego de presentar mejoría clínica fueron: sin inhibidor: M1 = 55 ± 12 y M2 = 42 ± 11 , con inhibidor: M1 = 87 ± 5 y M2 = 10 ± 5 . Se encontraron diferencias significativas antes y después de la mejoría clínica para M1 y M2 en ausencia de inhibición ($p < 0.001$), mientras que no hubo diferencias significativas al agregar el inhibidor ($p > 0.05$). En todos estos casos la respuesta al cambio de terapia fue favorable, observándose que el comportamiento de M1 y M2 sin inhibición se asemejó a los individuos sanos una vez que los pacientes fueron tratados con la droga que se asoció con la mejoría clínica.

En la Fig. 1 (c) es posible observar el cambio en el perfil de un paciente con CU en actividad (c1) y luego de presentar una mejoría clínica (c2) a los nueve días de haber recibido una infusión de Infliximab. La Fig. 1 (d) corresponde a un paciente que fue tratado con 6-mercaptopurina durante 1 mes, antes (d1) y después (d2) de dicho tratamiento.

Si bien existe consenso respecto de la participación de la gp-P en la patogenia de la CU, los datos aportados por la literatura muestran dos posturas controvertidas. Por un lado, Farrell y col. han descrito la sobreexpresión de la proteína en distintos tipos celulares, particularmente en pacientes refractarios. Por otro lado, se postula que la CU podría asociarse a una condición de hipoexpresión y/o hipofunción de la gp-P donde su falla conllevaría a una sobreexposición intracelular a productos tóxicos por falta de eliminación hacia el lumen del intestino.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo nos permiten observar una correlación entre la ausencia de inhibición, la mayor actividad de la gp-P y la refractariedad a los fármacos, por lo cual determinaciones secuenciales de gp-P podrían dar lugar a la detección temprana de una respuesta individual a un determinado tratamiento. La observación preliminar en doce pacientes donde se realizaron cambios en el tratamiento podría ser un indicio de la respuesta al mismo. Corroborar esta información es imprescindible para evaluar la utilidad del ensayo en el seguimiento longitudinal de cada paciente en particular.

La inhibición de la gp-P podría tener importantes implicancias terapéuticas en los casos de resistencia a la inmunoterapia asociada a esta proteína, ya que existen numerosas drogas disponibles que podrían ensayarse para revertir este cuadro. En esta situación sería de interés la determinación individual de la función de la gp-P con el fin de elegir una terapia acorde al paciente.

A su vez, ha sido postulado que a pesar de que el sistema inmune de mucosas opera en forma separada del sistema inmune sistémico, la similitud entre los niveles de expresión de MDR de los linfocitos de circulación e intraepiteliales sugieren que la expresión constitutiva del MDR está conservada, en los distintos subcompartimientos donde se encuentran estas células⁷. De corroborarse esta correlación, se podría utilizar el estudio de linfocitos de sangre periférica como muestra de estudio en la evaluación de la resistencia y el seguimiento del tratamiento.

En conclusión, a partir de las observaciones realizadas, podemos inferir una mayor actividad de la gp-P en pacientes refractarios, mientras que los pacientes respondedores presentan igual nivel de actividad que los individuos sanos. Estos resultados sugieren un posible papel de la gp-P en la refractariedad al observarse una correlación entre la respuesta individual a los fármacos y la función de la misma. Por otro lado, observamos un mayor transporte de rodamina en pacientes que presentan un cuadro de CU activa, lo cual indicaría una mayor función de la gp-P. Una vez obtenida la mejoría clínica frente al cambio de tratamiento, los niveles de función de gp-P descienden de manera significativa.

El estudio del transportador podría ser una herramienta de valor en el seguimiento longitudinal de los pacientes con CU y en la detección temprana de una respuesta individual a un determinado tratamiento, que parece evidenciarse antes de que los cambios endoscópicos sean concluyentes. Finalmente, la ampliación del estudio en curso en nuestro Centro, nos ayudará a evaluar el posible rol de la gp-P en la patogenia de la CU, contribuyendo a aclarar si estos cambios son primarios o secundarios a la respuesta clínica.

Financiamiento: Este estudio fue parcialmente financiado por el subsidio UBACYT B040.

Conflictos de interés: Los autores no tienen conflictos de interés para declarar.

Bibliografía

- Harrison. Principios de Medicina Interna. Mc Graw Hill Ed. 2005; 2: 1957-71.
- Lin JH, Yamazaki M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics - Clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42: 59-98.
- Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 2007; 446: 749-57.
- Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KL, Pollack GM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 2001; 21: 778-96.
- Kim RB. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug Metab Rev* 2002; 34: 47-54.
- Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 3-29.

7. Farrell R, Murphy A, Long A, et al. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology* 2000; 118: 279-88.
8. Farrell RJ, Meconi MJ, Keates AC, Kelly CP. P-glycoprotein-170 inhibition significantly reduces cortisol and ciclosporin efflux from human intestinal epithelial cells and T lymphocytes. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1021-31.
9. Langmann T, Moehle C, Mauerer R, et al. Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology* 2004; 127: 26-40.
10. Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3636-44.
11. Ho G-T, Moodie FM, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? *Gut* 2003; 52: 759-66.
12. Bøyum A. Separation of white blood cells. *Nature* 1964; 204: 793-4.
13. Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 1992; 80: 2735-9.
14. Donnenberg VS, Buckart GJ, Griffith BP, Jain AJ, Zeevi A, Donnenberg AD. P-glycoprotein is upregulated in peripheral T-cell subsets from solid organ transplant recipients. *J Clin Pharmacol* 2001; 41: 1271-9.
15. Beck WT, Grogan TM, Willman CL, et al. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. *Cancer Res* 1996; 56: 3010-20.

We have to shed the utopian imagery of the past 50 years. Health for all is unattainable. A disease-free world is an illusion. Death in good health is a contradiction. Health, life, and living with disease have to be purchased. Our technological development has overtaken our ethics.

Tenemos que desprendernos de la imagen utópica de los pasados 50 años. La salud para todos es inalcanzable. Un mundo libre de enfermedades es una ilusión. La muerte en buena salud es una contradicción. La salud, la vida y vivir con una enfermedad se deben comprar. Nuestro desarrollo tecnológico ha sobrepasado nuestra ética.

Imre Loeffler (1929-2007)

Managing chronic disease. *Brit Med J* 2001; 323: 241. (Número del 28 de julio, dedicado a la salud de los excluidos; acceso libre: www.bmj.com).