ADRIANA MORGAN DE OLIVEIRA

Expressão da quimiocina SDF-1 α (CXCL12) e seu respectivo receptor CXCR4 em células de pacientes com mieloma múltiplo e linhagem de células de mieloma múltiplo humano (RPMI-8226) após tratamento com talidomida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Dra. Estela Maria Novak

São Paulo

2008

Dedicatória

Aos meus pais **Maria Helena** e **José** (*in memorian*), por tudo já alcançado nesta vida;

Ao meu querido **Filipe Fonoff**, pelo incentivo, paciência e carinho;

Aos meus sobrinhos queridos: **Marina**, **Julia** e **Otávio**, pelo carinho e muito amor.

A DEUS:

“Aclamai a Deus, toda a terra,

Cantai a glória de seu nome,

Rendei-lhe glorioso louvor.

Dizei a Deus: Vossas obras são
estupendas!

Tal é o vosso poder que os próprios
inimigos vos glorificam”

Salmos 66

Agradecimentos

À Dra Estela Maria Novak pela confiança em mim depositada, incontestável apoio, por sua orientação segura e a oportunidade dada para que eu aqui chegasse,

Ao Prof. Dr Sergio Paulo Bydlowski Laboratório de Genética e Hematologia Molecular – LIM 31 pela oportunidade de estar neste laboratório;

Ao Dr Durvanei por quem tenho profundo respeito e admiração pelo auxílio na realização deste trabalho;

À Dra Camila pela ajuda nas informações clínicas;

À Denise e Rita Sousa pela amizade e ajuda nas atividades laboratoriais;

Ao Dr Antonio Carlos Magnanelli pelos ensinamentos transmitidos,

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia da Fundação Pró-Sangue: Denise, Andréia, Débora, Cleide, Luciana, Adriana Debes, Fernanda, Ester, Jorge, Gustavo, Felipe, Nair, Rosângela, João, Aruan, Rafael, Ritinha, Nathália, Linah, e Samanta pelos momentos de descontração;

A todos os colegas do laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan pela ajuda, cooperação e amizade;

Agradecimento especial para Dra Débora Levy e Cleide por toda ajuda na correção e formatação desta dissertação.

“Dificuldades e obstáculos são fontes valiosas de saúde e força para qualquer sociedade.”

Albert Einstein

“Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações.”

Vinícius de Moraes

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Mieloma múltiplo.....	2
1.2 Perfil laboratorial e genético do mieloma múltiplo.....	4
1.3 Abordagens metodológicas para o estudo do mieloma múltiplo.....	5
1.3.1 Citogenética.....	5
1.3.2 FISH (Hibridização <i>in situ</i> fluorescente).....	6
1.3.3 Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase.....	7
1.4 Fisiologia do mieloma múltiplo.....	7
1.5 Relação entre o microambiente da medula óssea e as células do mieloma múltiplo.....	9
1.6 Características gerais das quimiocinas e seus receptores.....	13
1.7 Mecanismos de ação do SDF-1 α e seu receptor CXCR4 em mieloma múltiplo.....	17
1.8 Talidomida e o mieloma múltiplo.....	20

1.8.1 Características gerais da talidomida.....	20
1.8.2 Mecanismo de ação da talidomida no mieloma múltiplo.....	21
1.8.3 Efeito da talidomida sobre as quimiocinas em outras doenças.....	26
1.9 Efeito de diferentes drogas sobre as quimiocinas em células de mieloma múltiplo.....	26
2.OBJETIVO.....	29
3.MÉTODOS.....	31
3.1 Cultura celular.....	32
3.1.1 Tratamento de células de mieloma múltiplo humano (RPMI- 8226) com talidomida.....	32
3.1.2 Determinação da viabilidade das células RPMI-8226 tratadas com talidomida.....	33
3.1.2.1 Ensaios de viabilidade das células RPMI-8226 tratadas com MTT.....	33
3.2 Perfil dos pacientes com mieloma múltiplo estudados.....	34
3.3 Protocolo de tratamento dos pacientes com talidomida.....	35
3.4 Preparação das células mononucleares.....	35
3.5 Expressão da proteína SDF-1 α em células RPMI-8226 e em células de pacientes com mieloma múltiplo através da determinação pelo método de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....	36
3.5.1 Células RPMI-8226.....	36

3.5.2 Pacientes.....	37
3.6 Análise da expressão do receptor CXCR4 através do método de citometria de fluxo em células RPMI-8226 e pacientes com mieloma múltiplo.....	37
3.7 Extração de RNA total e síntese do DNA complementar.....	38
3.8 Expressão dos genes SDF-1 e CXCR4 através do ensaio de RT-PCR semiquantitativo.....	39
3.9 Expressão dos genes SDF-1 α e CXCR4 através do método quantitativo RT-PCR em tempo real.....	41
3.10 Análises estatísticas.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1 Análise de citotoxicidade da talidomida em células RPMI-8226.....	47
4.2 Expressão da proteína SDF-1 α em células RPMI-8226 tratadas com talidomida.....	48
4.3 Expressão da proteína CXCR4 na superfície das células RPMI-8226.....	49
4.4 Expressão gênica das quimiocinas SDF-1 α e CXCR4 em linhagem de mieloma humano (RPMI-8226).....	52
4.4.1.1 Análise semiquantitativa pelo método de RT-PCR.....	52
4.4.2 Expressão relativa genes SDF-1 α e CXCR4 em células RPMI-8226 através da técnica RT-PCR em real time.....	53
4.5 Análise da proteína SDF-1 α em pacientes com mieloma múltiplo	

pelo método de ELISA.....	55
4.6 Análise do receptor CXCR4 pelo método de citometria de fluxo em pacientes com mieloma múltiplo.....	56
4.7 Expressão dos genes SDF-1 α e CXCR4 analisados pelo método de RT-PCR semiquantitativo.....	57
4.8 Expressão dos genes SDF-1 α e CXCR4 analisados pelo método de RT-PCR em tempo real.....	58
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	67
7. ANEXOS.....	69
8. REFERÊNCIAS.....	78

Lista de Abreviaturas

°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
bFGF	fator de crescimento de fibroblasto
C	citosina
CD 138	ou sindecano-1 é um proteoglicano de heparan-sulfato transmembranar que regula a atividade de adesão, migração e fator de crescimento.
cDNA	ácido desoxiribonucleico complementar
CT	controle
Ct	<i>cycle threshold</i> - ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial
CXCL1	ligante de quimiocina
CXCL8	ligante de quimiocina
CXCR3	receptor de quimiocina tipo 3
CXCR4	receptor de quimiocina tipo 4
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FISH	hibridização <i>in situ</i> fluorescente

g	grama
G	guanina
G1	fase do ciclo celular
GAGs	proteoglicanos
GAPDH	gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IGF-1	fator de crescimento insulina-like
IgH	imunoglobulina cadeia pesada
IgL	imunoglobulina cadeia leve
IL-1 β	interleucina 1 β
IL-3	interleucina 3
IL-5	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
Kda	quilodalton
Kg	quilograma
LFA-1	antígeno associado à função leucocitária
M	molar
MCF-7	linhagem de células de câncer de mama
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MGUS	gamopatia de significado indeterminado
MIP-1 α	proteína 1 α macrófago inflamatório
MIP-1 β	proteína 1 β macrófago inflamatório

mL	mililitro
MM	mieloma múltiplo
MM.1S	linhagem de células de mieloma múltiplo humano
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
M-SCF	fator estimulador de colônias de macrófagos
MTT	3-4,5-dimetiltiazol-2,5-brometo de difeniltetrazólico
ng	nanôgrama
OPG	osteoprotegerina
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
PM	peso molecular
RANK	receptor do fator $\kappa\beta$
RANKL	ligante do receptor do fator $\kappa\beta$
RNA	ácido ribonucléico
RPMI-8226	linhagem de células de mieloma múltiplo humano
RT-PCR	transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase
SD	desvio padrão
SDF-1 α	fator 1 α derivado de estroma
SFB	soro fetal bovino
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TB	tuberculose
TDL	talidomida
TNF- α	fator de necrose tumoral

VCAM	molécula de adesão célula vascular
VEGF	fator crescimento vaso endotelial
VLA-4	integrina $\alpha 4\beta 1$

Lista de figuras

Figura 1 - Esquema do desenvolvimento do mieloma múltiplo.....	03
Figura 2- Mielograma de paciente com mieloma múltiplo.....	04
Figura 3 - Interação da célula do mieloma múltiplo com células do estroma.....	10
Figura 4 - Produção da IL-6 através das células do estroma da medula óssea.....	11
Figura 5 - Quimiocinas e seus receptores.....	14
Figura 6 - Mecanismo de quimiotaxia mediado por quimiocinas.....	16
Figura 7 - Movimentação das células tronco através da interação SDF-1 α /CXCR4.....	18
Figura 8 - Estrutura e bioatividade da talidomida.....	21
Figura 9 - Esquema do promotor do gene VEGF e os domínios de ligação dos fatores de transcrição.....	23
Figura 10 - Mecanismo de ação da talidomida como droga anti-angiogênica.....	24
Figura 11 - Efeito imunomodulador da talidomida.....	26
Figura 12 - Curva de dissociação dos genes.....	44
Figura 13 - Citotoxicidade das células RPMI-8226 nas concentrações de 10, 20, 100 e 200 μ M, nos tempos 24 e 48 horas.....	48
Figura 14 - Presença da proteína SDF-1 α no lisado e sobrenadante, das células RPMI-8226, expostas durante 24 e 48 horas à talidomida (TLD) e analisadas pelo método de Elisa.....	49

Figura 15 - Expressão do receptor CXCR4 nas células RPMI-8226 tratadas com talidomida (TLD) e não tratadas (controle) durante 24 e 48 horas, através da análise de citometria de fluxo.....	50
Figura 16 - Histograma representativo da análise da expressão do receptor CXCR4 em células RPMI-8226, tratadas com talidomida através da análise por citometria de fluxo.....	51
Figura 17 - Expressão dos genes SDF-1 α e CXCR4 em linhagem de células RPMI-8226.....	52
Figura 18 - Expressão relativa dos genes SDF-1 α e CXCR4 em células RPMI-8226, tratadas com 10, 20 e 100 μ M de talidomida durante 48 horas.....	54
Figura 19 - Expressão do ligante SDF-1 α nos grupos de pacientes com mieloma múltiplo.....	55
Figura 20 - Expressão do receptor CXCR4 nos grupos de pacientes recém-diagnosticados (Recém), pacientes tratados sem talidomida (Sem TLD) e pacientes tratados com talidomida (TLD) através da análise de citometria de fluxo.....	56
Figura 21 - Expressão dos genes CXCR4 e SDF-1 α em pacientes MM através da técnica de RT-PCR.....	58
Figura 22 - Análise da expressão relativa dos transcritos SDF-1 α e CXCR4 analisados através da técnica de RT-PCR real-time.....	60

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados para amplificação dos genes SDF-1 α e CXCR4.....	43
--	----

Resumo

Oliveira AM. Expressão da quimiocina SDF-1 α (CXCL12) e seu respectivo receptor CXCR4 em células de pacientes com mieloma múltiplo e linhagem de células de mieloma múltiplo humano (RPMI-8226) após tratamento com talidomida [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 92p.

O mieloma múltiplo (MM) é a segunda doença com maior prevalência nas doenças malignas hematológicas, incurável, com média de sobrevivência de 3 a 5 anos. Mieloma múltiplo é uma malignidade das células do plasma, caracterizada pela destruição e reabsorção e supressão da formação óssea. A quimiocina SDF-1 α (CXCL12) e seu receptor CXCR4 têm um importante papel direcional na migração, *homing* das células do plasma em mieloma múltiplo e mobilização das células de mieloma múltiplo para fora da medula óssea. A talidomida tem sido usada com êxito no tratamento de pacientes com MM múltiplo. Neste estudo, verificamos o efeito da talidomida na expressão da quimiocina SDF-1 α e seu receptor CXCR4, em pacientes com mieloma múltiplo e em linhagem de células de mieloma múltiplo humano (RPMI-8226) tratadas e sem tratamento de talidomida. As expressões das quimiocinas SDF-1 α e seu receptor foram analisados em amostras de medula óssea e de plasmas de 79 pacientes com mieloma múltiplo e na linhagem de células RPMI-8226 expostas ao tratamento nas concentrações de 10, 20 e 100 μ M, durante 24 e 48 horas, através das técnicas de citometria de fluxo, ELISA, RT-PCR e RT-PCR tempo real. Os resultados mostraram uma heterogênea expressão da quimiocina SDF-1 α e seu receptor CXCR4 nos pacientes com mieloma múltiplo estudados (n= 79). Os pacientes com mieloma múltiplo tratados com talidomida mostraram uma baixa expressão da quimiocina SDF-1 α e seu receptor CXCR4 quando comparados com pacientes recém diagnosticados para mieloma múltiplo e pacientes com mieloma múltiplo tratados com outros medicamentos. A diminuição da expressão do SDF-1 α e CXCR4 também foi observado na linhagem de células RPMI-8226 expostas nas diferentes concentrações de talidomida quando comparados com as células RPMI-8226 não tratadas

(células sem adição de talidomida). Os resultados deste estudo sugerem que a talidomida pode afetar a expressão do SDF-1 α e CXCR4 no mieloma múltiplo.

Descritores: 1- Mieloma Múltiplo, 2-Linhagem de células, 3-Quimiocina SDF-1 α , 4- Receptor de quimiocina CXCR4, 5- Talidomida e 6 - Medula Óssea.

Summary

Oliveira AM. Expression of the chemokine SDF-1 α And its receptor CXCR4 In the cells of patients with multiple myeloma and line cell of the multiple myeloma after treatment of thalidomide [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 92p.

Multiple Myeloma (MM) is a second most prevalent hematological malignancy and remains incurable with a median survival of 3-5 years. MM is a plasma cell malignancy characterized by devastating bone destruction due to the enhanced bone resorption and suppressed bone formation. This disease is characterized by B-cell malignancy presence that substantially causes skeletal dysfunction during the course of the disease. The chemokine stromal-derived factor-1 α (SDF-1 α) and its receptor CXCR4 play an important role in directional migration, homing of plasma cells in multiple myeloma (MM) and mobilization of MM cells out of the bone marrow. The drug thalidomide has been successfully used in the treatment of patients with MM. In this study, we assessed the effect of thalidomide on SDF-1 α and CXCR4 expression in MM patients and human myeloma-derived cell line, RPMI 8226 treated with or without thalidomide. SDF-1 α and CXCR4 expression were analyzed in bone marrow and blood plasma of 79 MM patients by flow cytometry, ELISA, and Real-time RT-PCR. To confirm the effect of thalidomide on SDF-1 α and CXCR4 expression a human myeloma-derived cell line, RPMI 8226, was exposed to 10, 20 and 100 μ M/L thalidomide for 24 and 48 hours. A heterogeneous expression pattern of chemokines SDF-1 α and CXCR4 receptor were observed for all MM patients studied. However, patients treated with thalidomide showed a significantly decrease in expression of SDF-1 α and CXCR4 as compared to newly diagnosed MM patients and MM patients treated with other drugs. RPMI 8226 cell line treated with 10, 20 and 100 μ M thalidomide also demonstrated decrease in SDF-1 α and CXCR4 expression as compared with cell control (RPMI-8226 without thalidomide). Our results indicate that thalidomide therapy induces down-regulation of CXCR4 and its ligand SDF-1 α in multiple myeloma.

Discriptors: 1-Multiple Myeloma, 2-Cell line, 3-Chemokine, 4- SDF-1 α , 5-CXCR4 receptor,6 – Thalidomide, 7- Bone Marrow.

1. Introdução

1.1 Mieloma múltiplo

O mieloma múltiplo (MM) é um câncer originário da medula óssea, a partir do crescimento anômalo de uma das células do sistema imunológico, os plasmócitos (Kyle *et al.*, 2008, Vacca *et al.*, 2006). Normalmente o indivíduo com mieloma múltiplo apresenta anemias, infecções bacterianas, insuficiência renal, fraturas, hipercalcemia extensa e destruições esqueléticas com lesões osteolíticas (Bataille *et al.*, 2003, Richardson *et al.*, 2007).

O mieloma múltiplo afeta terminalmente a diferenciação das células B e evolui para diferentes fases: 1) fase inativa, na qual as células do tumor são plasmócitos maduros não proliferativos, 2) fase ativa, com pequena porcentagem (<1%) de proliferação de células plasmoblásticas, e 3) fase fulminante, com a ocorrência da proliferação extramedular e aumento das células plasmoblásticas (Kyle *et al.*, 2008). Na medula óssea as células precursoras pró-B (células pró-B) sofrem rearranjo estrutural nos genes IgH e IgL antes de se tornarem células B maduras (Chng *et al.*, 2006), (figura 1).

O mieloma múltiplo é uma doença hematológica que atinge cerca de 10% das neoplasias hematológicas. O tratamento de mieloma múltiplo consiste em altas doses de quimioterapia e transplantes autólogos, que podem aumentar a sobrevivência em média de 3 a 5 anos, comparada com apenas 3 anos em tratamentos convencionais (Chng *et al.*, 2006).

Figura 1 - Esquema do desenvolvimento do mieloma múltiplo (Adaptado de Sirohi *et al.*; 2004)

1.2 Perfil laboratorial e genético do mieloma múltiplo

Como os plasmócitos no mieloma múltiplo têm um baixo potencial proliferativo, os métodos de citogenética convencionais (Giemsa ou bandeamento G) detectam alteração cromossomal somente em 30 a 50% dos casos. Na rotina laboratorial o mielograma é o exame de escolha (Figura 2).

Figura 2 - Mielograma de paciente com mieloma múltiplo: (Células da medula óssea coradas com Leishman. Plasmócitos (seta) com citoplasma corado intensamente com azul de metileno (basófilo) e o núcleo em púrpura (acidófilo). (Foto extraída de: http://pleiad.umdj.edu/hemepath/pc/pc_smeas_img.html)

1.3 Abordagens metodológicas para o estudo do mieloma múltiplo

1.3.1 Citogenética

O estudo do mieloma múltiplo por citogenética é dificultado principalmente pelo baixo índice mitótico da doença, conseguindo-se metáfases somente em 20%-30% dos casos. Além disso, a técnica não permite diferenciar as células tumorais das restantes populações celulares. Isto leva muitas vezes a resultados falsos negativos, baseados na análise cariotípica de células mielóides em divisão presentes na medula óssea.

Por outro lado, esta técnica não detecta alterações como a $t(4;14)(p16;q32)$, e raramente detecta a $t(14;16)(q32;q23)$ e a $-17p13$. Por todas as considerações anteriores, a sua utilização foi amplamente substituída pela técnica de FISH. Contudo, continua sendo uma abordagem recomendada para a identificação da $-13q14$, a qual, quando detectada por citogenética, está relacionada com um pior prognóstico que quando detectada por FISH. Também é uma ferramenta adequada para o estudo de alterações cromossômicas numéricas.

1.3.2 FISH (Hibridização *in situ* fluorescente)

A técnica de FISH é atualmente a metodologia mais utilizada no estudo das alterações cromossômicas no MM.

Esta pode ser realizada a partir de células em interfase, eliminando as limitações metodológicas da citogenética relacionadas com o baixo índice proliferativo. A partir da sua introdução houve uma mudança na caracterização molecular da doença, aumentando a frequência de detecção das alterações consideravelmente. Assim, por exemplo, a frequência da -13q14 aumentou de 10%-15% para 40%-50%. Além disso, permitiu a identificação da t(4;14)(p16;q32), previamente desconhecida (Falcão *et al.*, 2007)..

a) Purificação celular: utilizando-se anticorpos anti-CD138 pode ser realizada a separação positiva dos plasmócitos por meio de colunas magnéticas ou sorting. A grande limitação desta abordagem é a perda considerável de células durante o processo de purificação, (Falcão *et al.*, 2007).

b) clg-FISH: a combinação da técnica de FISH com a detecção das células plasmáticas por meio de anticorpos fluorescentes anticadeia leve ou citoplasmáticas permite identificar os plasmócitos e realizar a análise, exclusivamente nessa população. Somente são necessárias 100 células plasmocitárias para se avaliar o caso, (Falcão *et al.*, 2007).

1.3.3 Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase

A identificação do ponto de quebra do cromossomo 4 na t(4;14)(p16;q32) permitiu utilizar a técnica de RT-PCR para a sua detecção de forma rotineira. Esta técnica apresenta alta sensibilidade própria da reação de PCR, eliminando a necessidade da separação da população tumoral.

Além disso, nos casos positivos, a detecção da translocação pode ser utilizada como marcador no acompanhamento da doença residual mínima.

1.4 Fisiologia do mieloma múltiplo

Normalmente os plasmócitos constituem uma porção muito pequena (menos de 5%) das células da medula óssea. Entretanto, os portadores de mieloma têm um crescimento descontrolado de plasmócitos na medula óssea (mais de 10%, às vezes acima de 90%) (Kyle *et al.*, 1994). A presença de acentuado número de plasmócitos no mieloma múltiplo é denominada de plasmocitoma. (Kyle *et al.*, 1994; Hallek *et al.*, 1998).

Quando esta massa de plasmócitos está localizada em um único osso é chamada plasmocitoma solitário. Se os plasmócitos estiverem localizados fora da medula (p.ex., intestino, pulmão, seios da face, faringe), o plasmocitoma é denominado de extramedular. É importante ressaltar que os pacientes com mieloma múltiplo podem ter um ou mais plasmocitomas e nem sempre os pacientes com plasmocitomas apresentam mieloma múltiplo. Um plasmocitoma

é considerado um sinal de que o paciente tem um risco significativo de um dia desenvolver mieloma múltiplo. (Kyle *et al.*, 1994).

Outro evento importante que ocorre no MM é o aumento da perda óssea devido a estimulação das células responsáveis pela reabsorção óssea, os osteoclastos, que resulta da interação entre células tumorais no microambiente da medula (Barillé *et al.*, 2003).

Estudos recentes mostram que os plasmócitos dos pacientes com mieloma múltiplo expressam elevadas quantidades de receptor de ativação de fator nuclear κ B (RANK), podendo estimular diretamente o desenvolvimento dos osteoclastos (Boissy *et al.*, 2005).

Estudos recentes mostraram que as células de mieloma múltiplo expressam quimiocinas MIP-1 α e MIP-1 β , induzem o aumento da expressão de RANKL pelos osteoblastos e diminuem a produção de osteoprotegerina (OPG) no ambiente da medula óssea. OPG é um fator que antagoniza o efeito de RANKL preservando a integridade óssea. RANKL liga-se ao seu receptor RANK, iniciando a diferenciação e ativando a sinalização em precursores osteoclastos, promovendo a reabsorção óssea. As citocinas que atuam na doença óssea do mieloma estimulam a expressão de RANKL (Barillé *et al.*, 2003)

1.5 Relação entre o microambiente da medula óssea e as células do mieloma múltiplo

O microambiente da medula consiste em proteínas da matriz extracelular, células estromais da medula, células do endotélio vascular, osteoblastos, osteoclastos e linfócitos. A interação das células do mieloma com as proteínas da matriz extracelular e células estromais da medula, juntamente com os fatores no microambiente da medula (citocinas) têm um importante papel na patogênese do mieloma (Giuliani *et al.*, 2006, Hayashi *et al.*, 2003, Hideshima *et al.*, 2001).

Na fase inicial do mieloma múltiplo, os plasmócitos localizados na medula óssea interagem com as células do estroma e raramente são encontrados em outros locais (Hallek *et al.*, 1998). A interação entre as células do mieloma múltiplo com as proteínas da matriz e células do estroma da medula óssea (interações tumor–hospedeiro) contribui para a sobrevivência, proliferação e progressão das células do MM (Vacca *et al.*, 1994). A ligação das células do mieloma com as células estromais da medula induz a transcrição e à secreção das citocinas, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator derivado do estroma-1 (SDF-1 α) (Hayashi *et al.*, 2003) e a interleucina 6 (IL-6) – principal fator de crescimento e sobrevivência dos plasmócitos (Grupta *et al.*, 2001, Klein *et al.*, 1999, Neiva *et al.*, 2005), (figura 3).

Figura 3 – Interação da célula do mieloma múltiplo com células do estroma na medula óssea e expressão de citocinas (esquema adaptado - Ludwig *et al.*, 2005)

A IL-6 é uma citocina importante no desenvolvimento do MM, produzida de maneira parácrina pelas células do MM e pelas células do estroma da medula óssea, como observado na figura 4. A IL-6 produzida pelas células do estroma da medula óssea induz o aumento da produção e secreção do VEGF pelas células do mieloma múltiplo e, reciprocamente, o VEGF secretado pelas células do mieloma múltiplo aumenta a produção do IL-6 pelas células do estroma da medula óssea. Este mecanismo de estímulo e secreção envolvendo a IL-6 e o VEGF é definido como "loop" autócrino e parácrino (Podar *et al.*, 2001). O

VEGF é produzido tanto pelas células do mieloma múltiplo, como pelas células do estroma da medula óssea (Vacca *et al.*, 1994; Podar *et al.*, 2001).

Figura 4 – Produção da IL-6 através das células do estroma da medula óssea, contribuindo para sobrevivência dos plasmócitos (Esquema adaptado Vacca *et al.*, 2003)

Recentemente, foi demonstrado que as citocinas expressas na medula óssea: LIF, VEGF, bFGF, MIP-1 α , SDF-1 α , IL-1 β , SCF e IL-3 ativam a via MAPK e induzem a proliferação das linhagens de células de mieloma múltiplo: MM.1S e RPMI-8226, e a sobrevivência de células de pacientes com mieloma múltiplo (Lentzsch *et al.*, 2004).

Também foi observado que a migração dos plasmócitos para medula óssea, assim como sua quimiotaxia no microambiente da medula no MM, é

dirigida pela interação dos receptores quimiocinas e seus ligantes. (Heidemann *et al.*, 2004; Aggarwal *et al.*, 2006; Alsayed *et al.*, 2007).

No mieloma múltiplo, as células expressam uma variedade de receptores de quimiocinas (CCR1, CCR5, CXCR3, CCR6 e CXCR4) e secretam várias quimiocinas ligantes (MIP-1 α , MIP-1 β , SDF-1 α , CXCL e RANTES) (Pellegrino *et al.*, 2004), as quais participam no homing das células, no crescimento do tumor e na progressão do tumor (Heidemann *et al.*, 2004; Aggarwal *et al.*, 2006; Alsayed *et al.*, 2007).

A expressão da quimiocina SDF-1 α e seu receptor CXCR4 na linhagem RPMI-8226 foi previamente descrita por Trentin *et al.*, 2007; Hideshima *et al.*, 2001 e Zannettino *et al.*, 2007. Estudos recentes demonstraram, em linhagens de células de mieloma múltiplo humano RPMI-8226 e U266, e em células de plasmócitos de pacientes com mieloma múltiplo, a expressão de outros receptores como, por exemplo, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR6 e CCR2. (Moller *et al.*, 2003; Nakayama *et al.*, 2003; Pellegrino *et al.*, 2004; Alsayed *et al.*, 2007).

A quimiocina SDF-1 α e seu receptor CXCR4 têm um papel indireto na promoção do crescimento e sobrevivência das células do MM, através do aumento da secreção das citocinas IL-6 e VEGF pelas células do estroma da medula óssea (Heidemann *et al.*, 2004; Bachelder *et al.*, 2002).

1.6 Características gerais das quimiocinas e seus receptores

As quimiocinas são pequenas proteínas quimiotáticas secretadas por várias células sobre influência de citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e células cancerígenas (Luster, *et al.*, 1998, Murphy *et al.*, 2001). Estas quimiocinas regulam o transporte celular, especialmente recrutando leucócitos para os seus sítios alvos, e têm um papel importante, não somente nas reações inflamatórias e imunes, como também na progressão do câncer. (Luster *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2005).

As quimiocinas constituem uma superfamília de pequenas proteínas (8-14 KDa), da qual participam mais de cinquenta quimiocinas que exercem a sua ação via interação com receptores específicos (Murdoch *et al.*, 1999).

As quimiocinas são subdivididas em quatro famílias: CXC, CC, XC e CX3C, dependendo do posicionamento do resíduo de cisteína no N-terminal da molécula protéica. Nestas moléculas, C representa resíduos de cisteína e X é qualquer outro resíduo de aminoácido (figura 5). As quimiocinas CC apresentam um rearranjo de uma cisteína adjacente à outra. As quimiocinas CXC têm 4 resíduos de cisteínas, sendo que os 2 primeiros resíduos de cisteínas conservados são separados dos outros dois resíduos de cisteínas por um resíduo de aminoácido não conservado, como observado no receptor CXCR4 e seu ligante SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1 ou CXCL12) (Luster *et al.*, 1998 e Murphy *et al.*, 2001).

A divisão das quimiocinas CXC é baseada na presença ou ausência da sequência ELR (Glu-Leu-Arg) localizadas na região N-terminal da proteína (ELR+). As quimiocinas ELR+ apresentam uma importante implicação fisiológica em termos angiogênicos, enquanto que as quimiocinas não-ELR (ou ELR-) são anti-angiogênicas ou angiostáticas (Rosenkilde *et al.*, 2004).

Figura 5 – Quimiocinas e seus receptores subdivididos em quatro famílias: CXC, CC, XC e CX3C. (www.microbiologybytes.com/virology/AIDSII.html)

A ligação das quimiocinas aos seus respectivos receptores acoplados na proteína G e presentes na membrana plasmática de células alvo, leva à reorganização do citoesqueleto e adesão com células endoteliais levando à migração destas células (Moller *et al.*, 2003 e Rosenkilde *et al.*, 2000).

A transmigração dos leucócitos ocorre no sistema vascular através das células do endotélio, processo que envolve uma cascata seqüencial de citocinas pró-inflamatórias secretadas e presentes na superfície dessas células, tais como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{IL-1}\beta$, moléculas de adesão e quimiocinas. As citocinas se ligam às cadeias (GAGs) dos proteoglicanos presentes na superfície das células endoteliais e componentes da matriz extracelular, promovendo uma sinalização direcional que as células podem usar para navegar em regiões inflamatórias.

Esta reação provoca adesão dos leucócitos aos sítios específicos nos vasos sanguíneos e faz com que ultrapassem a barreira do tecido, migrando para outros órgãos (figura 6).

Figura 6 – Mecanismo de quimiotaxia mediado por quimiocinas

As quimiocinas interferem na oncogênese de 3 maneiras: inicialmente, controlando a infiltração leucocitária. Os leucócitos podem contribuir para sobrevivência do tumor como fonte de fatores de crescimento e angiogênicos (Leek *et al.*, 1996, Ueno *et al.*, 2000). Posteriormente, várias quimiocinas agem como fatores de crescimento para as células tumorais, como por exemplo, IL-8 (ou CXCL8) e CXCL1/GRO α , os quais estimulam o crescimento de carcinomas broncogênicos e melanoma, respectivamente. E, finalmente, as quimiocinas influenciam a migração de células tumorais (Bachelder *et al.*, 2002).

1.7 Mecanismos de ação do SDF-1 α e seu receptor CXCR4 em mieloma múltiplo

A quimiocina SDF-1 α é primariamente expressa em altos níveis pelas células do estroma da medula óssea (Alsayed *et al.*, 2007), e células do mieloma múltiplo (Moller *et al.*, 2003). O CXCR4 é expresso na superfície das células do mieloma múltiplo e do endotélio, mas não são expressos pelas células do estroma da medula óssea (Alsayed *et al.*, 2007).

A quimiocina SDF-1 α se liga ao seu receptor CXCR4, um receptor com 7 domínios transmembranas ligado à proteína G. Esta ligação desencadeia e ativa a cascata da via de sinalização PI3K e ERK/MAPK.(Aggarwal *et al.*, 2006 e Alsayed *et al.*, 2007). Com esta interação, o SDF-1 α induz o rearranjo do citoesqueleto, formação de pseudopodia e internalização do receptor CXCR4, nas células de MM. No primeiro momento ocorre mudança do citoesqueleto em resposta ao SDF-1 nas células de MM. A translocação da superfície do CXCR4 para o compartimento intracelular ocorre em resposta ao SDF-1 α . A localização subcelular do CXCR4 no MM aumenta a ativação da via de sinalização Ras-ERK. É possível também que ocorra uma interação do CXCR4 com outros receptores antes da internalização e ativação das vias de sinalização (Aggarwal *et al.*, 2006; Alsayed *et al.*, 2007).

As quimiocinas SDF-1 α /CXCR4 não só regulam a migração, como também a adesão, invasão e mobilização das células de MM fora da medula óssea. (Aggarwal *et al.*, 2006; Alsayed *et al.*,2007),

Figura 7 – Movimentação das células tronco através da interação das quimiocinas SDF-1 α /CXCR4 (www.weizmann.ac.il/imm/Lapidot Page.html)

A movimentação das células tronco CXCR4 positivo (*rolling*) ocorre com a interação das células endoteliais que expressam as proteínas de superfície selectinas E e P. Estas proteínas promovem uma adesão temporária das células tronco. As células tronco CXCR4⁺ são ativadas através da interação do ligante SDF-1 α , o qual foi secretado pelas células estromais da medula óssea que desencadeiam a interação de moléculas de adesão LFA-1/ICAM-1 e VLA-4/VCAM-1 conferindo firme adesão entre as células tronco e as células

estromais. Eventualmente as células tronco podem migrar para outros nichos de células tronco, os quais consistem de células estromais e moléculas de adesão. O SDF-1 α rapidamente aumenta a atividade de adesão das células de MM mediadas pela regulação das integrinas VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) a fibronectina e VCAM-1, aumentando a invasão e a secreção de metaloproteinases no mieloma múltiplo e contribuindo para o trânsito das células do mieloma múltiplo no microambiente da medula óssea. (Aggarwal *et al.*, 2006; Alsayed *et al.*, 2007) (figura 7).

Estudos demonstraram um aumento da expressão de CXCR4 e SDF-1 em linfonodos, pulmão, fígado e medula óssea, órgãos sabidamente alvos das metástases do câncer de mama (Muller *et al.*, 2001). Entretanto, outros estudos demonstraram uma correlação inversa entre expressão de CXCR4 nas células de Mieloma Múltiplo e a atividade da doença (Moller *et al.*, 2003; Vande Broek *et al.*, 2003; Alsayed *et al.*, 2007). Os dados demonstraram que os baixos níveis de expressão do receptor CXCR4 em mieloma múltiplo estão correlacionados com o pior prognóstico ao paciente e com a progressão da doença. (Alsayed *et al.*, 2007).

Estes resultados também mostraram que altos níveis de SDF-1 α na medula óssea de pacientes com uma atividade maior da doença estão associados com o menor nível de expressão de CXCR4 na superfície das células de mieloma múltiplo (Moller *et al.*, 2003; Vande Broek *et al.*, 2006; Alsayed *et al.*, 2007).

Em pacientes com mieloma múltiplo ativo, os quais expressaram altos níveis de CXCR4 no sangue periférico, apresentam nível de expressão de CXCR4 diminuído na medula óssea. Esses pacientes apresentaram altos níveis de SDF-1 α na medula, provavelmente como mecanismo para confinar as células na medula óssea e evitar mais adiante trânsito das células para outros ambientes extras medulares (Alsayed *et al.*, 2007).

1.8 Talidomida e o mieloma múltiplo

1.8.1 Características gerais da talidomida

Talidomida [2-(2-6-dioxo-piperidine-3-yl) isso-indole-1,3-dione] foi usada inicialmente na Alemanha em 1950 e, dois anos mais tarde, na Inglaterra, como sedativo e anti-emético para gestantes; posteriormente foi descartada devido ao seu efeito teratogênico (Murakami *et al.*, 2007). Esta droga foi associada à má formação fetal, sendo retirada de circulação mundial em 1961 (Meierhofer *et al.*, 2001). Hoje sabe-se que a característica teratogênica da talidomida durante a gravidez (28-42 dias após a concepção) foi causada pela inibição da formação normal dos vasos sangüíneos (Rajkumar *et al.*, 2000).

Stephens *et al.*, 2000, demonstraram que apenas o isômero S(-) tem propriedades teratogênicas, porque possui dois anéis de fitalamida paralelos acomodando-se na fita de DNA das células.

Sob o ponto de vista do efeito da droga, a forma R(+) atua como sedativo e a forma S(-) é a forma potencialmente inibitória da liberação do fator de

necrose tumoral (TNF α), através de células mononucleares do sangue periférico (Franks *et al.*, 2004).

A compreensão do modo de atuação da talidomida *in vivo* tem sido dificultada pela interconversão espontânea dos enantiômeros S e R; tal fato impossibilita a total separação dos seus respectivos efeitos. A talidomida é espontaneamente hidrolisada em solução aquosa pH 7,0 (figura 8). (Franks *et al.*, 2004).

Figura 8 - Estrutura e bioatividade da talidomida

1.8.2 Mecanismo de ação da talidomida no mieloma múltiplo

Em 1998, a talidomida foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA), nos Estados Unidos, para o tratamento de eritema nodoso hansênico. O efeito anti-angiogênico da talidomida foi inicialmente descrito por D'Amato *et al.*,

2001, que demonstraram a inibição do fator de crescimento do fibroblasto básico pela talidomida em córneas neovascularizadas de coelhos.

Apesar de na época o FDA não ter indicado a talidomida para o tratamento de câncer, o interesse da atividade anti-angiogênica da talidomida tem levado alguns especialistas a usarem esta droga no tratamento de tumores hematológicos e sólidos. Em 1999, Singhal *et al.*, descreveram atividade da talidomida no tratamento de pacientes com mieloma múltiplo refratário ao tratamento convencional (quimioterapia e radioterapia).

Posteriormente, Barlogie *et al.* (2001) demonstraram que 32% dos 84 pacientes com mieloma múltiplo refratários a outros tratamentos tiveram uma resposta significativa ao tratamento com talidomida. A toxicidade da talidomida no tratamento de mieloma múltiplo é considerada moderada, conforme descrito por Singhal *et al.* (1999) e Barlogie *et al.* (2001).

Em um estudo recente, Drucker *et al.* (2003), citaram um dos mecanismos de ação da talidomida através da inibição do IGF-1.e o caminho bFGF-2 (fator de crescimento de fibroblasto básico 2). Outros estudos mostraram que a talidomida não apenas inibe a angiogênese, mas também atua diretamente induzindo à apoptose ou parada do ciclo em G1 em plasmócitos (Lewis *et al.*, 1994), eliminando as moléculas de adesão dos plasmócitos às células do estroma da medula. Uma importante hipótese a respeito do mecanismo de ação da talidomida como droga anti-angiogênica foi proposta por Stephens *et al.* (2000); neste estudo os autores sugerem que os isômeros S(-) da talidomida, intercalam-se em regiões ricas em nucleotídeos CG (citosina-guanina),

impedindo a ligação do fator de transcrição SP1 à região do promotor nos genes VEGF, α v e β v integrina. Este bloqueio da transcrição resultaria numa diminuição da eficiência da expressão destes genes (Stephens *et al.*, 2000; Pagès *et al.*, 2005), (figura 9). O isômero R (+) não apresenta afinidade por nucleotídeos guanina e adenina (Stephens *et al.*, 2000).

Figura- 9 Esquema do promotor do gene VEGF e os domínios de ligação dos fatores de transcrição

Outros mecanismos de ação da talidomida no mieloma múltiplo são: A) Inibição direta do crescimento e sobrevivência dos plasmócitos tumorais e das células estromais da medula. B) Alteração da produção e atividade das citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF- α envolvidas no crescimento e sobrevivência dos plasmócitos, portanto inibindo o tumor. C) Alteração das moléculas de adesão localizadas na superfície dos plasmócitos e nas células estromais, não

ocorrendo a liberação de citocinas que contribuem para o crescimento do tumor, possibilitando a resistência de algumas drogas. D) Inibição de VEGF e bFGF que são fatores que promovem a angiogênese (Vacca *et al.*, 2003), figura 10.

Figura 10 - Mecanismo de ação da talidomida como droga anti-angiogênica segundo Vacca *et al.*, 2003

A talidomida poderia também estimular as células T, que atacam diretamente as células tumorais, ou ainda promover a produção de células matadoras naturais – “natural killer”, que estimulam o sistema imunológico a combater os plasmócitos tumorais. Este efeito, sendo um potente imunomodulador, inibe a angiogênese, aumenta o efeito do sistema imune, inibe as ligações celulares tumorais às células do estroma e inibe várias

citocinas, através da degradação do RNAm $\text{TNF-}\alpha$, como observado nas células de HIV (Melchert *et al.*, 2007) conforme demonstrado na figura 11.

Figura 11 – Efeito imunomodulador da talidomida (esquema adaptado de Melchert *et al.*, 2007)

1.8.3 Efeito da talidomida sobre as quimiocinas em outras doenças

A talidomida tem um efeito benéfico no tratamento de pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e tuberculose (TB), estimulando a resposta imune tipo Th1, assim como no tratamento de mieloma múltiplo.

O mecanismo pelo qual a talidomida atua em pacientes com HIV sugere uma degradação do RNAm do fator de necrose tumoral α (TNF- α). A talidomida reduziria a produção da síntese da proteína TNF α , inibindo as quimiocinas CXCR4 e CCR5.

Entretanto, até o momento, nada se sabe sobre um possível efeito da talidomida sobre as quimiocinas CXCR4 e SDF-1 α em pacientes com Mieloma Múltiplo.

1.9 Efeito de diferentes drogas sobre as quimiocinas em células de mieloma múltiplo

O envolvimento do SDF-1 α na promoção da proliferação, migração e proteção contra dexametasona foi demonstrado por Hideshima *et al.*, 2002.

Gazitt *et al.* (2004) demonstraram que em cada ciclo da mobilização das células hematopoiéticas da medula, as células do mieloma múltiplo perdem as moléculas de adesão e a sinalização do receptor CXCR4 e as células do

mieloma múltiplo sobreviventes são liberadas para a circulação a partir do sítio primário ou secundário (exemplo medula óssea ou nódulos linfáticos).

As células da medula circulam até que ocorra a reexpressão das moléculas de adesão e do receptor CXCR4. Subsequentemente, as células de mieloma migram e hospedam as células estromais na medula ou na matriz extramedular em sítios determinados, usando a sinalização SDF-1 α /CXCR4 ou outras quimiocinas (exemplo MIP-alfa). Consequentemente, as repetições dos ciclos de quimioterapia podem resultar em um aumento na resistência às drogas e na disseminação da doença.

Um importante antagonista competitivo do CXCR4, conhecido como AMD3100 AnorMED,(Toronto,ON,Canadá), vem sendo utilizado no tratamento do MM; esta droga interrompe a ligação do SDF-1 ao seu receptor, facilitando a mobilização das células tronco dentro da medula óssea nos pacientes com Mieloma Múltiplo (Alsayed *et al.*, 2007).

O avanço no entendimento do mecanismo da sobrevivência e migração das células do mieloma múltiplo é muito importante, uma vez que novas terapias poderão ser desenvolvidas a partir deste conhecimento.

2. Objetivo

Estudar a expressão da quimiocina SDF-1 α (CXCL-12) e seu respectivo receptor CXCR4 em células de pacientes com mieloma múltiplo e em linhagem de células de mieloma múltiplo humano (RPMI 8226), após tratamento com talidomida.

3. Métodos

3.1 Cultura celular

A linhagem celular de mieloma múltiplo humano (RPMI-8226), (ATCC CCL-50) American Type Culture Collection. (Rockville, MD, USA) foi cultivada em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen) com 10% soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen), 2 μ M L-glutamina (Invitrogen), 100U/ml penicilina (Invitrogen) e 100 μ g/ml estreptomicina (Invitrogen). As células foram mantidas em estufa com 5% de atmosfera de CO₂ a 37°C. Para determinação da curva de crescimento das células RPMI-8226 foi utilizado o método de exclusão por Trypan Blue como descrito por Drucker *et al.* (2003).

3.1.1 Tratamento de células de mieloma múltiplo humano (RPMI-8226) com talidomida

As células RPMI-8226 incubadas com 10, 20 e 100 μ M de talidomida, durante 24 e 48 horas, foram previamente descritas por Bauer et al., 1998 e Vacca et al. 2005, respectivamente. A talidomida foi solubilizada em DMSO (sigma) nas concentrações citadas acima e diluída em meio de cultura imediatamente antes do uso. A concentração final de DMSO usada em todos os experimentos foi menor que 0,01% como descrito por Hideshima *et al.*, 2001. Como controle negativo, para exclusão de morte pelo DMSO, foram utilizadas células RPMI-8226 tratadas na concentração de 0,01% do diluente. O ensaio foi realizado em triplicata. Células RPMI-8226 sem tratamento de talidomida mantidas nas mesmas condições também foram usadas como controle.

As concentrações de 10 e 20µM equivalem à quantidade de talidomida encontrada em fluidos intersticiais de um paciente adulto com 70 Kg (Bauer et al.,1998). Já a concentração de 100µM equivale a uma dose acumulativa de talidomida, (Vacca *et al.*, 2005).

3.1.2 Determinação da viabilidade das células RPMI-8226 tratadas com talidomida

3.1.2.1 Ensaio de viabilidade das células RPMI- 8226 tratadas com 3-4,5-dimetiltiazol-2,5-brometo de difeniltetrazólico (MTT)

As células RPMI-8226 (1×10^4 células/poço) cultivadas em placas de 96 poços foram tratadas com talidomida nas concentrações de 10, 20, 100 e 200µM, dissolvidas em meio de cultura RPMI-1640, enriquecido com soro fetal bovino 10% e submetidas ao ensaio colorimétrico para quantificação de proliferação e viabilidade celular com 3-4,5-dimetiltiazol-2,5-brometo de difeniltetrazólico (MTT). Os ensaios foram interrompidos após 24 e 48 horas de incubação, de acordo com as especificações do fabricante (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) e analisados em leitor de microplaca Bio-Rad Model 550 com filtro de 450 a 550 nm.

3.2 Perfil dos pacientes com mieloma múltiplo estudados

Para estudar o efeito da talidomida na expressão da quimiocina SDF-1 α e seu receptor CXCR4, foram utilizados aspirados de medula óssea de 79 pacientes, procedentes da Divisão de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da USP (Processo nº498/05), e todos os pacientes foram previamente esclarecidos sobre a pesquisa que seria desenvolvida, tendo assinado um termo de consentimento para a utilização do material colhido.

Os pacientes estudados foram classificados de acordo com critérios estabelecidos pelo Chronic Leukemia- Myeloma Task Force, (anexo 1); e Salmon & Durie *et al.*, 1975, (anexo 2). As características clínicas dos pacientes conforme estes critérios estão demonstradas no anexo 3.

Os pacientes foram divididos em 3 grupos: grupo 1) Pacientes recém-diagnosticados para MM. Estes pacientes não receberam medicamentos para MM (n=31); grupo 2) Pacientes sem talidomida (n=38). Este grupo foi composto por pacientes com mieloma múltiplo tratados com outras drogas, diferentes da talidomida, incluindo altas doses de dexametasona, melfalan e dexametasona, melfalan e prednisona (MP), ciclofosfamida e prednisona, transplantes autólogos ou ciclofosfamida, melfalan, CCNU (lomustina), vincristina e prednisona; grupo 3) Pacientes tratados com talidomida (n=10). Este grupo foi composto por pacientes com mieloma múltiplo, que fizeram uso da talidomida

durante 3 a 40 meses (mediana 5 meses). Todos os pacientes deste grupo já faziam uso de outras drogas, incluindo altas doses de dexametasona, melfalan e dexametasona, melfalan e predinisona (MP), ciclofosfamida e predinisona, transplantes autólogos ou ciclofosfamida, melfalan CCNU (lomustina), vincristina e predinisona.

3.3 Protocolo de tratamento dos pacientes com talidomida

O tratamento dos pacientes com mieloma múltiplo foi iniciado com uma dose de 100 mg talidomida (Talidomida TM, Fundação Ezequiel Dias, Brasil) por dia, via oral, e com um aumento progressivo da dose até 300mg/dia, conforme tolerância máxima de cada paciente. Estes pacientes receberam talidomida por no mínimo 3 meses

3.4 Preparação das células mononucleares

As células mononucleares obtidas a partir de amostras de medula óssea dos pacientes com mieloma múltiplo foram separadas em gradiente de densidade com 5 ml de Ficoll-Paque (Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden), conforme descrito por Trentin *et al.*, 1999.

As amostras foram centrifugadas a 400g durante 30 minutos a 25°C (Podar *et al.*, 2001; Grupta *et al.*, 2002). As células isoladas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato, pH 7.4 (PBS) e centrifugadas a 400g.

Os plasmócitos foram isolados através de coluna de afinidade com anticorpo anti CD138, conforme descrição do fabricante (Miltenyi Biotec, Aurbun, CA, USA) e descrito por Trentin *et al.*, 1997. A população celular obtida continha mais 98% de plasmócitos, conforme revelado pelo método de citometria de fluxo usando um marcador específico de plasmócitos o anticorpo CD138/38 (BD Biosciences, San Diego, CA; (Trentin *et al.*, 1997).

3.5 Expressão da proteína SDF-1 α em células RPMI-8226 e em células de pacientes com mieloma múltiplo através da determinação pelo método de ELISA (enzyme-linked immunosobent assay)

3.5.1 Células RPMI-8226

A expressão da quimiocina SDF-1 α foi analisada no sobrenadante e lisado de células RPMI-8226 tratadas e não tratadas (controle) com talidomida, pelo método de ELISA de acordo com o as condições descritas pelo fabricante (Ray Biotech ® Human SDF-1 α ELISA KIT) e conforme descrito por Aiuti *et al.*, 1997.

As células RPMI-8226 na concentração de 1×10^5 células/ poço foram cultivadas em placas de 6 poços e tratadas com 100 μ M de talidomida, 0,01% de DMSO e como controle (células sem adição da talidomida), durante períodos de 24 e 48 horas. Após o período de incubação com a talidomida, as células

foram lisadas; as amostras do sobrenadante e lisado de células foram congeladas a -20°C, até o momento do uso.

3.5.2 Pacientes

A expressão da quimiocina SDF-1 α também foi analisada nos plasmas obtidos das amostras de sangue dos pacientes dos grupos: recém diagnosticados, pacientes tratados sem talidomida e pacientes tratados com talidomida. As amostras foram coletadas em tubos contendo EDTA, congelados e mantidos a -20°C, até o momento do uso. Como controle para as amostras dos pacientes com mieloma múltiplo foi utilizado sangue periférico de doadores (indivíduos saudáveis).

Os ensaios foram realizados em triplicata e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com intensidade de 450 a 550 nm em leitor Bio-Rad (Model 550).

3.6 Análise da expressão do receptor CXCR4 através do método de citometria de fluxo em células RPMI-8226 e pacientes com mieloma múltiplo

A expressão do receptor CXCR4 nas células de mieloma múltiplo foi analisada através do método de citometria de fluxo, conforme descrito por Alsayed *et al.*, 2007.

As células RPMI-8226 (controle), células RPMI-8226 tratadas com 100 μ M de talidomida e células RPMI-8226 tratadas somente com 0,01% de DMSO; assim como as células mononucleares isoladas de amostras de medula óssea de pacientes com mieloma múltiplo, dos 3 grupos (pacientes recém-diagnosticados, pacientes tratados sem talidomida e pacientes tratados com talidomida) foram avaliadas através do protocolo de dupla-marcação, usando CXCR4 (sCD184) CD-184-PE(555974; BD Biosciences, San Diego, CA), CD-38-APC (340665, BD Biosciences) e G1-PE (#340761 BD Biosciences) como controle isotipo para expressão de CXCR4. Foi analisado um total de 10000 eventos (células) para cada amostra e avaliada a detecção de fluorescência através do aparelho FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Os dados foram analisados usando software WinMDI 2.8. Para comparar a intensidade de coloração através da fluorescência das células dos diferentes grupos de pacientes e das células RPMI-8226 foram calculados os raios de intensidade de fluorescência.

3.7 Extração de RNA total e síntese do DNA complementar

As amostras de células RPMI-8226 tratadas e não tratadas com talidomida e as amostras dos pacientes com MM dos 3 grupos foram submetidas ao processo de extração de RNA total, com o reagente Trizol[®] (Invitrogen, Rockville, MD) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a verificação da integridade do RNA total, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1% coradas por brometo de etídeo e as bandas 28S e 18S foram visualizadas em equipamento de transiluminador Image Master® VDS, através da leitura da absorbância a 260 e 280 nm. As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C.

A síntese do DNA complementar foi realizada a partir de 3µg de RNA total das amostras obtidas conforme descrito acima. A preparação foi realizada conforme a descrição do fabricante PROMEGA.

A síntese do DNA complementar foi realizada para o volume final de reação 20µL nas seguintes proporções: 3µg de RNA total, 1µL Random Primers (20 pmol), 4µL Improm-II (5X Reaction Buffer), 1µL de dNTP mix (10mM de cada dNTP), 1µL de Improm-II (Reverse Transcriptase), H₂O tratada com DEPC para completar o volume final de 20µL. As amostras foram submetidas a variações de temperaturas: 25 °C por 5 minutos, 55 °C por 1 hora e 70 °C por 15 minutos em termociclador.

3.8 Expressão dos genes SDF-1 e CXCR4 através do ensaio de RT-PCR semiquantitativo

A expressão dos genes CXCR4 e SDF-1α nas amostras dos pacientes e em células RPMI-8226 tratadas e não tratadas foi analisada inicialmente através do método de RT-PCR semiquantitativo.

O gene CXCR4 foi amplificado nas seguintes condições: 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto. A sequência dos *primer* utilizado foi: *sense* foi 5'- AGC ACC AGC GGT TAC CAT GGA – 3'- e *antisense* 5'- GAG TGT GAC AGC TTG GAG ATG –3' , conforme descrito por Garcia *et al.*, 2004. O tamanho do fragmento amplificado foi de 702 pares de bases.

O gene SDF-1 α foi amplificado nas seguintes condições: um ciclo de 95 °C por 90 segundos, 20 ciclos a 95°C por 60 segundos e 60 °C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos. A sequência dos *primer* utilizado foi: *sense* foi 5'- CCG CGC TCT GCC CAG CGA CGG GAAG – 3'- e *antisense* 5'- CTT GTT TAA AGC TTT CTC CAG GTA CT -3' , conforme descrito por Takamoto *et al.*, 2000. O tamanho do fragmento amplificado foi 227 pares de bases.

A amplificação do fragmento do GAPDH foi nas seguintes condições: um ciclo de 95 °C por 90 segundos, 20 ciclos a 95°C por 60 segundos, 60 °C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos. O *primer* utilizado foi: *sense* 5'- CCCTCCAAAATCAAGTGGGG-3' e *antisense* :5'-CGCCACAGTTTCCC GGAGGG -3'. O tamanho do fragmento amplificado foi de 200 pares de bases.

Todas as reações de RT-PCR foram feitas em duplicatas. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, preparados com tampão TAE 1X e 2 μ l de brometo de etídeo.

3.9 Expressão dos genes SDF-1 α e CXCR4 através do método RT-PCR em tempo real

As amostras de células RPMI-8226 tratadas e não tratadas com talidomida e as amostras dos pacientes com mieloma múltiplo dos 3 grupos também foram analisadas pelo método quantitativo RT-PCR em tempo real, utilizando o termociclador Rotor Gene RG-3000 (Cobert Research, AUS).

O protocolo utilizado foi Platinum SYBR Green PCR Super Mix-UDG conforme descrito pelo fabricante (Invitrogen®). Desta forma, 25 μ L Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG reagent (Invitrogen), 1 μ L ROX Reference Dye (Invitrogen), 1 μ L de cDNA de cada amostra em estudo, 10 μ M de cada primer específico para cada gene foi adicionado para um volume total de 50 μ L. As condições de amplificação foram: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Os genes CXCR4 e SDF-1 α utilizaram *primers* descritos por Hong *et al.*, 2005. Estes primers continham as mesmas quantidades de CG e condições de hibridização dos genes (tabela 1) e as seqüências dos amplicómeros se encontravam em diferentes éxons, evitando a contaminação com DNA genômico. A reação para cada gene analisado foi cuidadosamente padronizada a fim de evitar amplificação inespecífica. Como controle da reação foram usadas amostras com ausência de RNA ou cDNA, em cada um dos ensaios de RT-PCR em tempo real.

A detecção dos produtos foi feita pelo monitoramento do sinal fluorescente emitido pelo corante SYBR Green (Invitrogen), que intercala a dupla fita do DNA, obtido no final de cada ciclo. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar ou cycle threshold (Ct), onde o aumento do sinal associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado (Ginzinger DG, 2002), e analisados através do programa Rotor Gene software. Os níveis de expressão dos genes CXCR4 e SDF-1 α foram normalizados em relação ao RNAm do gene endógeno (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - GAPDH), conforme descrito por Adams et al., 2003, e Livak et al., 2001. O método utilizado neste ensaio foi o método relativo ou $2^{-\Delta CT}$ (Livak et al., 2001). Para utilizarmos o método relativo ou $2^{-\Delta CT}$, foi necessário determinarmos inicialmente a eficiência de amplificação dos genes alvos e do controle endógeno.

Assim, foi realizada uma curva com diluições seriadas do RNA total extraídos da linhagem de células de câncer de mama (MCF-7) nas concentrações de 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 e 500 ng e amplificados para cada um dos genes estudados. Cada uma das diluições foi posteriormente amplificada por RT-PCR nas mesmas condições. As amostras foram amplificadas em duplicata. Tomou-se também o cuidado de verificar a especificidade da reação de RT-PCR realizando-se a curva de dissociação. A reação sendo específica para os produtos de PCR analisado, mostrou um gráfico com apenas um único pico a uma determinada temperatura em todas as amostras (figura 12).

Para comparar a eficiência de amplificação dos genes em estudo, os valores de Ct do gene alvo foram subtraídos dos valores de Ct do gene GAPDH. Também se calculou o ΔCt de cada amostra, subtraindo-se os valores do Ct do gene alvo dos valores de Ct do gene controle (GAPDH). A diferença foi *plotada* contra o logarítmo da quantidade da amostra inicialmente colocada. A inclinação da reta ou slope menor que 0.1 indicamos que a eficiência de amplificação é comparável, podendo-se, portanto, aplicar o método comparativo ou $2^{-\Delta Ct}$.

Os níveis dos transcritos SDF-1 α e CXCR4 foram classificados como negativos, quando o valor de referência foi menor que 0.01. Como referência foram usadas amostras reunidas em um grupo de RNAm de medula óssea de 6 doadores de medula sadios, que apresentaram um valor transcrito menor de que 0.01. A amostra de medula óssea de doadores foi utilizada apenas como parâmetro da expressão gênica dos genes estudados.

Tabela- 1. Seqüência de primers utilizados para amplificação dos genes SDF-1 α e CXCR4

GENE	PRIMER SENSE	PRIMER ANTISENSE	Tamanho
SDF-1 α	5'ACTGGGTTTGTGATTGCCTCTGAAG-3'	5'GCGAAGAAAGCCAGGATGAGGAT-3'	150pb
CXCR4	5'ACTGGGTTTGTGATTGCCTCTGAAG3'	5'GGAACCTGAACCCCTGCTGTG3'	130pb

Figura 12 – Curva de dissociação dos genes: A) GAPDH, B) SDF-1 α , C) CXCR4 para verificação da especificidade da reação. Na abscissa observa-se a temperatura em graus Celsius e na ordenada observa-se a intensidade de fluorescência.

3.10 Análises estatísticas

A significância estatística foi desenvolvida utilizando ANOVA para múltiplas comparações seguidas pelo teste de Mann-Whitney. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. A menos que estejam indicado todos os dados foram determinados de 3 experimentos independentes, cada um deles em triplicata.

4. Resultados

4.1 Análise de citotoxicidade da talidomida em células RPMI-8226

Para verificar a relação dose-resposta da talidomida nas células de mieloma múltiplo foram utilizadas as concentrações de 10, 20, 100 e 200 μ M de talidomida, baseadas em estudos que comprovam a ação direta destas concentrações em células tumorais, sugerindo o seu potencial clínico (Bauer et al., 1998, Hideshima *et al.*, 2000, Ducker *et al.*, 2003). A concentração 100 μ M talidomida, como descrita previamente por Hideshima *et al.* (2000), e 200 μ M potencializam o seu efeito citotóxico nestas células e permitiram verificar a expressão dos genes em estudo afetada pela ação da talidomida.

Os nossos resultados mostraram que o tratamento da cultura de células RPMI-8226 com as diferentes concentrações (10, 20, 100 e 200 μ M) de talidomida, apresentou uma diminuição significativa da viabilidade celular somente no período de 24 horas em relação ao controle ($p < 0.05$), (figura 13). As concentrações de 100 μ M e 200 μ M de talidomida apresentaram um efeito citotóxico mais acentuado que as outras concentrações, porém, em relação ao tempo de incubação entre estas concentrações (100 e 200 μ M), verificamos que o efeito citotóxico foi maior em 24 horas, em relação ao período de 48 horas, levando em consideração o tempo de duplicação destas células que é de 30 a 40 horas.

Figura 13 – Citotoxicidade das células RPMI-8226 nas concentrações de 10, 20, 100 e 200 μ M, nos tempos 24 e 48 horas (N=3)

4.2 Expressão da proteína SDF-1 α em células RPMI-8226 tratadas com talidomida

A presença da proteína ligante SDF-1 α foi analisada no sobrenadante e no lisado das células RPMI-8226 tratadas com 100 μ M de talidomida, nos períodos de exposição de 24 e 48 horas e comparados com o controle (célula RPMI-8226 sem tratamento com talidomida). Nestas amostras não foram observadas diminuições significativas nos níveis da proteína SDF-1 α no sobrenadante (3,9

± 0.03 ng/mL) em relação ao controle ($3,9 \pm 0.06$ ng/mL) em 24 horas ($p > 0.05$); no sobrenadante ($3,7 \pm 0.05$ ng/mL) em relação ao controle (3.9 ± 0.17 ng/mL) em 48 horas ($p > 0.05$) (Figura 14 A). Resultados semelhantes foram observados nas amostras lisadas ($3,8 \pm 0.02$ ng/mL) em relação ao controle (4.0 ± 0.07 ng/mL) em 24 horas ($p > 0.05$) e lisados ($3,7 \pm 0.07$ ng/mL) em relação ao controle (4.0 ± 0.01 ng/mL) em 48 horas ($p > 0.05$) (Figura 14 B).

Figura 14-Presença da proteína SDF-1 α no lisado (A) e sobrenadante (B) das células RPMI 8226, expostas durante 24 e 48 hs a talidomida(TLD) e analisadas pelo método de Elisa. O controle (CTL) do ensaio são células RPMI8226 sem tratamento com talidomida. Resultados são expressos como média ± 1 SD ($p > 0.05$)

4.3 Expressão da proteína CXCR4 na superfície das células RPMI-8226

O efeito inibitório da talidomida no receptor CXCR4 expresso na superfície da membrana das células RPMI-8226 foi analisado pelo método de citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que nas células RPMI-8226 tratadas com 100 μ M de talidomida durante 24 horas, apenas 10.5% expressaram CXCR4,

não apresentando assim, nenhuma diferença significativa quando comparada com as células RPMI-8226 sem talidomida (controle) que expressaram 10.1%, ($p>0,07$). Resultado similar foi observado nos ensaios onde as células RPMI-8226 foram expostas com 100 μ M de talidomida, durante 48 horas, e apenas 12 % destas células apresentaram marcação da proteína CXCR4 em comparação a 13,4% das células controle ($p>0,09$); (figura 15).

Figura 15 – Expressão do receptor CXCR4 das células RPMI -8226 tratadas com talidomida (TLD) e não tratadas (controle) durante 24 e 48 horas, através da análise de citometria de fluxo. Resultados são expressos como média $\pm$ 1 SD ($p>0.05$)

Figura 16 – Histograma representativo da análise da expressão do receptor CXCR4 em células RPMI-8226, tratadas com talidomida através da análise por citometria de fluxo. A) células RPMI-8226 (controle), B) células RPMI-8226 tratadas com 100 μ M talidomida (24 horas). C) células RPMI-8226 (controle), D) células tratadas com 100 μ M de talidomida (48 horas). A seta indica a presença de duas populações celulares na linhagem de células RPMI-8226

4.4 Expressão gênica das quimiocinas SDF-1 α e CXCR4 em linhagem de mieloma humano (RPMI-8226)

4.4.1 Análise semiquantitativa pelo método de RT-CR

Nas amostras de células RPMI-8226 tratadas com 100 μ M de talidomida, durante 24 e 48 horas, foi observada amplificação do fragmento de 227 pb do gene SDF-1 α . A expressão do gene CXCR4 não foi detectada nesta linhagem de células, provavelmente devido à baixa expressão deste receptor (figura 17).

Figura 17 – Expressão dos genes SDF-1 α e CXCR4 em linhagem de células RPMI-8226. A) Controle (CT), células RPMI-8226 tratadas com talidomida (TLD) e células RPMI-8226 tratadas com 0,01% de DMSO, durante 24 horas. B) Controle (CT), células RPMI-8226 tratadas com talidomida (TLD) e células RPMI-8226 com 0,01% DMSO. As setas indicam o tamanho do fragmento do gene amplificado. Foram consideradas controle (CT), as células não tratadas

4.4.2 Expressão relativa genes SDF-1 α e CXCR4 em células RPMI-8226 através da técnica RT-PCR em real time

As expressões dos genes SDF-1 α e CXCR4 foram afetadas significativamente nas células RPMI-8226 após exposição destas células com 10 μ M, 20 μ M e 100 μ M de talidomida durante 48 horas quando comparadas com o controle (células RPMI-8226 sem tratamento com talidomida). Nestes estudos foi observada uma diminuição dos transcritos dos genes SDF-1 α de 5, 8 e 10 vezes nas células tratadas, com 10 μ M, 20 μ M e 100 μ M de talidomida, respectivamente, em relação ao controle (figura 18 A). Resultado similar foi também observado na expressão do gene CXCR4, onde a expressão deste gene foi reduzida 3, 5 e 10 vezes em relação ao controle, após o tratamento destas células com 10 μ M, 20 μ M e 100 μ M de talidomida, respectivamente; (figura 18 B).

A-

B-

Figura 18 - Expressão relativa dos genes SDF-1α (A) e CXCR4 (B) em células RPMI-8226 tratadas com 10, 20 e 100 μM de talidomida durante 48 horas. Foi usado como controle células RPMI-8226 sem tratamento com talidomida. Os dados foram obtidos pela normalização relativa através do gene endógeno GAPDH. Resultados são expressos como média $\pm$ 1 SD. (** $p < 0.005$)

4.5 Análise da proteína SDF-1 α em pacientes com mieloma múltiplo pelo método de ELISA

Os ensaios de ELISA no sangue periférico dos pacientes com mieloma múltiplo, demonstraram uma diminuição nos níveis da proteína SDF-1 α presentes nos plasmas de pacientes tratados com talidomida ($1,58\text{ng/mL} \pm 0,016$), quando comparados com os níveis da proteína em pacientes recém-diagnosticados ($3,01\text{ ng/mL} \pm 0,128$) e no grupo de pacientes tratados sem talidomida ($2,82\text{ ng/mL} \pm 0,281$); figura 19.

Figura 19 – Expressão da proteína SDF-1 α nos grupos de pacientes com mieloma múltiplo. Resultados são expressos como média $\pm$ 1 SD (** $p < 0.001$)

4.6 Análise do receptor CXCR4 pelo método de citometria de fluxo em pacientes com mieloma múltiplo

Como revelado através do método de citometria de fluxo, realizado na superfície das células de mieloma múltiplo purificadas, a percentagem média dos pacientes que expressaram o receptor de quimiocina CXCR4 foi significativamente menor em pacientes tratados com talidomida (29,8%; intervalo entre 27,4 a 33,5%), quando comparado aos pacientes recém-diagnosticados (47%; intervalo entre 45,9 a 66,0%) e pacientes tratados sem talidomida (45%; intervalo entre 37 a 60%), figura 20.

Figura 20 – Expressão do receptor CXCR4 nos grupos de pacientes recém-diagnosticados (Recém), pacientes tratados sem talidomida (Sem TLD) e pacientes tratados com talidomida (TLD) através da análise de citometria de fluxo. Resultados são expressos como média $\pm$ 1 SD (* $p < 0.05$)

4.7 Expressão dos genes SDF-1 α e CXCR4 analisados pelo método de RT-PCR semiquantitativo

As expressões dos genes SDF-1 α e CXCR4 foram analisadas em 79 pacientes, separados nos grupos: pacientes tratados com talidomida, pacientes tratados sem talidomida e pacientes recém diagnosticados. Os resultados mostraram expressão dos genes SDF-1 α e CXCR4 de forma heterogênea (figura 21). Foram consideradas expressões positivas aquelas que apresentam o fragmento amplificado de 702 pb do gene CXCR4 e a presença do fragmento amplificado de 227 pb para o gene SDF-1 α , e visualizadas através do gel de agarose 1,5%. Foram consideradas amostras negativas aquelas amostras que não apresentaram amplificação do fragmento, ou não foram visualizadas no gel de agarose 1,5%. Neste resultado é possível observar a heterogeneidade na expressão dos pacientes tratados com talidomida.

Figura 21 - Expressão dos genes CXCR4 e SDF-1 α em pacientes MM. 1) pacientes recém diagnosticados, 2) pacientes tratados com talidomida 3) pacientes tratados sem talidomida. Fragmentos amplificados dos genes SDF-1 α (227 pb), CXCR4 (702 pb). Como controle endógeno foi utilizado o gene GAPDH (200 pb)

4.8 Expressão dos genes SDF-1 α e CXCR4 analisados pelo método de RT-PCR em tempo real

A análise molecular da expressão de SDF-1 α e CXCR4 nos 79 pacientes foram analisadas usando a técnica RT-PCR em tempo real. Os resultados revelaram que SDF-1 α foi expresso em 30% dos pacientes tratados com talidomida, comparados com 63% dos pacientes recém-diagnosticados e 56% dos pacientes tratados sem talidomida. A expressão de CXCR4 foi observada em 30% dos pacientes tratados com talidomida, comparado com 68% dos pacientes recém-diagnosticados e 60% dos pacientes tratados sem talidomida. Esses resultados mostraram que SDF-1 α foi transcrito 4 a 3 vezes a mais, respectivamente, em pacientes recém-diagnosticados ($p=0,0047$) e pacientes tratados sem talidomida, comparados com 1 vez e meia em pacientes tratados

com talidomida. A expressão do receptor CXCR4 foi transcrita 5 a 4 vezes a mais, respectivamente, em pacientes recém-diagnosticados e em pacientes tratados sem talidomida comparado com 2 vezes com pacientes tratados com talidomida (figura 22).

Figura 22 – Análise da expressão relativa dos transcritos SDF-1α (A) e CXCR4 (B) analisados através da técnica de RT PCR real-time nos grupos de pacientes com mieloma múltiplo: recém-diagnosticados (Recém), pacientes tratados sem talidomida (Sem TLD), pacientes tratados com talidomida (TLD), Doador. Os dados foram obtidos pela normalização relativa através do gene endógeno GAPDH. Resultados são expressos como média $\pm$ 1 SD
** $p < 0.005$

5. Discussão

A quimiocina SDF-1 α e seu receptor CXCR4 estão envolvidos na sobrevivência e crescimento de uma vasta variedade de tumores e suas metástases. Em particular, o SDF-1 α aumentou a sobrevivência das células malignas na presença do receptor CXCR4, bem como sua proliferação, invasão e dispersão de células neoplásicas.

O papel funcional da expressão de SDF-1 α e CXCR4 em mieloma múltiplo, assim como em diferentes tipos de tumores, é bastante controverso.

Recentemente, Alsayed *et al.* (2007), em um estudo *in vivo* em camundongos e Vande *et al.* (2006), em estudos clínicos descreveram uma correlação direta entre os baixos níveis de expressão de CXCR4 e atividades da doença em mieloma múltiplo. Alsayed *et al.* (2007), demonstraram que em pacientes com mieloma múltiplo ativo, os plasmócitos expressam mais CXCR4 em sangue periférico, mas esta expressão diminui dramaticamente na medula óssea, onde os níveis de SDF-1 são maiores e os plasmócitos estão potencialmente confinados dentro da medula, evitando o tráfico destas células. Assim, é possível observar que pacientes com gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS- Monoclonal gammopathy of undetermined significance) apresentam uma expressão de CXCR4 mais elevada na medula óssea do que os pacientes com mieloma múltiplo. Por outro lado, em outros tipos de câncer, a incidência de alta expressão do gene CXCR4 tem sido relacionada à progressão dos tumores, tais como tumores de mama e pâncreas (Helbig *et al.*, 2003; Koshiba *et al.*, 2000).

Recentemente, foi demonstrado que a expressão do receptor CXCR4 na superfície dos plasmócitos pode ser heterogênea, variando entre 10 a 100% nos pacientes com mieloma múltiplo estudados. Esta variação também foi observada em nosso estudo, quando comparamos os pacientes recém diagnosticados e pacientes sem tratamento com talidomida; esses dois grupos de pacientes foram utilizados como parâmetro de comparação para o grupo de pacientes tratados com talidomida e, apenas 47% e 45 %, respectivamente, expressaram este receptor na superfície dos plasmócitos. Esta análise foi realizada pelo método de citometria de fluxo. Por outro lado, quando comparamos este dois grupos com grupos de pacientes tratados com talidomida, a população de plasmócitos que expressou o receptor CXCR4 após o tratamento com talidomida foi apenas 29 %, mostrando um nítido efeito da talidomida sobre a população de plasmócitos que expressam o receptor CXCR4.

Para confirmar o efeito da talidomida na expressão dos genes SDF-1 α e CXCR4 em mieloma múltiplo, células de mieloma múltiplo humano foram expostas a doses fisiológicas equivalentes à quantidade de talidomida encontrada em fluidos intersticiais de um paciente adulto com 70 Kg. Os resultados confirmaram a presença de uma baixa expressão do SDF-1 α e CXCR4, apesar dos resultados de RT-PCR em tempo real neste estudo terem mostrado uma diminuição na expressão do gene CXCR4 na superfície das células RPMI-8226 tratadas com talidomida; o mesmo não foi observado quando estas células tratadas foram analisadas pelo método de citometria de

fluxo. Este resultado sugere que em consequência da pouca quantidade de CXCR4 presente na superfície da célula RPMI-8226, não foi possível ser detectada pelo método de citometria de fluxo, a variação entre o controle e as células tratadas.

O papel modulador da talidomida na expressão de CXCR4 foi mostrado até agora apenas por Juffermans *et al.* (2000) em pacientes infectados vírus imunodeficiência primária humana (HIV). Esses autores demonstraram em pacientes portadores de HIV (human immunodeficiency virus) que a talidomida suprime o aumento da expressão do CXCR4, por seletiva degradação do RNA mensageiro do TNF α . Entretanto, no mieloma múltiplo não há nenhum estudo mostrando o efeito da talidomida sobre a expressão das quimiocinas CXCR4 e SDF-1 α

A talidomida tem sido introduzida recentemente como um tratamento para mieloma múltiplo e tem modificado consideravelmente o paradigma de tratamento para esta doença em vários países (Pabumbo *et al.*, 2008; Lokhorst *et al.*, 2008).

O uso da talidomida tem se mostrado como tratamento de primeira linha em termos de resposta e tempo livre da doença (recidivas).

Recentes estudos sobre a talidomida têm indicado que seus mecanismos de ação são altamente complexos e envolvem diversos alvos moleculares. Podemos apenas especular sobre os mecanismos possíveis, pelos quais a talidomida poderia afetar a expressão SDF-1 α e CXCR4 em MM.

No entanto, alguns genes controlados pelo fator de transcrição SP1 e NF- κ B estão sujeitos também à modulação da talidomida. Desta forma um possível mecanismo, que já tem sido descrito para expressão dos genes VEGF e bFGF em mieloma múltiplo é que a talidomida modularia a expressão do genes SDF-1/CXCR4, através do controle da fatores de transcrição SP1, NF- κ B.

Helbig *et al.* (2003), demonstraram que o fator de transcrição NF- κ B causa migração das células de câncer de mama e sua metástase pela indução da expressão do receptor da quimiocina CXCR4. A expressão do receptor CXCR4 é dependente NF- κ B e aparenta requerer um elemento de resposta não clássico presente na seqüência de -66 a mais 7+ do promotor CXCR4 em câncer de mama. Este elemento resposta liga-se a ambos, o homodímero p50 ou p65p50 heterodímero in vitro. Além disso, dada a falta NF- κ B b clássico relacionados aos sítios de ligação , sugeriu-se que os fatores de transcrição tais como os ativadores de proteína SP1 e Fator 1 nuclear respiratório são responsáveis pela expressão constitutiva e induzida do CXCR4. Recentemente Huang *et al.* (2007), mostraram que em células pulmonares humanas SDF-1 α intensificam a mobilidade celular e aumento da regulação integrinas através CXCR4 através via ERK dependente NF- κ B. O SDF-1 α pode estar atuando através do CXCR4 para ativar a via sinalização ERK, que ativam IKK/beta e NF- κ B, resultando nas ativações das integrinas β 1 e β 3 assim contribuindo com a migração das células pulmonares cancerígenas.

Por outro lado, Garcia *et al.* (2005) demonstraram que SP-1, ERK e ativação do NF- κ B liga o promotor SDF-1 α em células de astrocitomas

(linhagem de células U373). Além disso, as mutações de SP-1 localizadas entre -57 e -39, encontram-se acima do principal sítio inicial e resulta na redução da marcação da atividade do promotor na linhagem U373.

KuKreja *et al.* (2005), sugeriram que a expressão do SDF-1 α induziu a expressão do receptor CXCR4 em células cancerígenas da próstata (PC-3) que é dependente da cascata de sinalização MEK/ERK e ativação do NF- κ B.

Outro possível mecanismo foi que a talidomida poderia estar modulando a expressão do CXCR4/SDF-1 α em mieloma múltiplo, por meio da redução dos níveis de TNF- α e/ou de outras interleucinas. Este mecanismo é consistente com observações feitas em pacientes com HIV (Singhal *et al.*, 1997).

Uma terceira possibilidade é a de ambos os mecanismos acima estarem envolvidos na modulação da expressão dos genes SDF-1 α /CXCR4. Além disso, a ausência ou baixa regulação da expressão do receptor CXCR4 poderia estar favorecendo disseminação das células de mieloma múltiplo para a circulação, contribuindo assim para a aceleração da progressão da doença. Assim, futuros estudos clínicos devem avaliar se a baixa regulação do receptor CXCR4 e seu ligante SDF-1 α induzido pelo tratamento com talidomida possa estar correlacionado com a progressão da doença e a sobrevivência de pacientes mieloma múltiplo.

6. Conclusão

Apesar de analisarmos um número limitado de pacientes tratados com talidomida, no presente estudo, observamos que:

As expressões das quimiocinas SDF-1 α e CXCR4 em pacientes com mieloma múltiplo tratados com talidomida são afetadas quando comparados com os pacientes com mieloma múltiplo sem qualquer tratamento (recém diagnosticados) ou tratados com outros medicamentos.

Doses fisiológicas de talidomida 10 e 20 μ M afetaram a expressão do ligante SDF-1 α e CXCR4, em linhagem de células de mieloma múltiplo humano (RPMI-8226)

Anexo 1 - Diagnóstico de mieloma múltiplo (MM) segundo os critérios definidos pelo Chronic Leukemia- Myeloma Task Force

CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICOS

CRITÉRIOS MAIORES

I – Plasmocitoma em biópsia de tecido

II – Medula óssea com plasmocitose > 30%

III – Pico monoclonal na eletroforese de proteínas com IgG > 3,5g/dl; IgA > 2,0 g/dl excreção de cadeia leve kappa ou lambda > 1,0g/24 horas na eletroforese de urina na ausência de amiloidose.

CRITÉRIOS MENORES

A – Medula óssea com 10-30% de plasmócitos

B – Presença de pico monoclonal, mas em níveis inferiores aos descritos acima

C – Lesões osteolíticas

D – Imunoglobulinas policlonais: IgM < 50 mg%, IgA < 100mg%, IgG < 600 mg%.

Obs: O diagnóstico de MM requer o mínimo de um critério maior mais um menor ou três critérios menores que devem incluir A + B:

1 – I+B, I+C, I+D

2 – II+B, II+C, II+D

3 – III+B, III+C, III+D

4 – A+B+C, A+B+D

Anexo 2 - Estadiamento segundo Durie e Salmon

ESTÁDIO	CRITÉRIO	MASSA TUMORAL (x 10 ¹² m ² células)
I	<p>1 – Hemoglobina > 10g/dl</p> <p>2 – Cálcio sérico normal</p> <p>3 – RX de esqueleto normal (escala 0) ou plasmocitoma solitário</p> <p>4 – Componente monoclonal</p> <p>IgG < 5g/dl</p> <p>IgA < 3g/dl</p> <p>Cadeia leve urinária < 4g/24h</p>	<0,6
II	NÃO ESTÁDIO I OU III	0,6-1,2
III	<p>UM OU MAIS DOS SEGUINTE</p> <p>1 – Hemoglobina < 8,5g/dl</p> <p>2 – Cálcio sérico > 12mg/dl</p> <p>3 – Lesões líticas avançadas (escala 3)</p> <p>4 – Componentes monoclonal</p>	>1,2

IgG > 7g/dl

IgA > 5g/dl

Cadeia leve urinária > 12g/24h.

- SUBCLASSIFICAÇÃO

a- Função renal normal (creatinina sérica < 2,0 mg/dl)

b- Função renal anormal (creatinina sérica ≥ 2,0 mg/dl)

- ESCALAS DAS LESÕES ÓSSEAS

* Esqueleto normal (0)

* Osteoporose (1)

* Lesões líticas (2)

* Destruição extensa e fraturas (3)

$\text{Cálcio corrigido (mg/dl)} = (\text{Cálcio medido mg/dl}) - (\text{Albumina g/dl}) + 4$

Anexo 3 – Parâmetros clínicos dos pacientes com Mieloma Múltiplo*

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Número de pacientes	31	38	10
Idade (mediana)	66 (50-81)	63 (35-85)	54 (41-68)
Mulher / Homen	17 / 14	20 / 18	6 / 7
Tipo Imunoglobulina [§]			
IgG	10/29 (35)	25/38 (66)	8/10 (80)
IgA	12/29 (41)	5/38 (13)	2/10 (20)
Não secretada	1/29 (4)	3/38 (8)	0
Cadeia leve	6/29 (20)	5/38 (13)	0
Plasmocitose medula óssea (%), média	24 (0,8-68,4)	25 (2,0-97)	53,6 (9-100)
β_2 microglobulina (mg/L) [§]			
< 3,5	5/26 (20)	12/27 (44)	4/7 (57,2)
≥ 3,5 and <5,5	9/26 (34)	7/27 (26)	1/7 (14,3)
≥ 5,5	12/26 (46)	8/27 (30)	2/7 (28,5)
Creatinina (mg/dL) (mediana)	0,6-15,3 (1,2)	0,6-6,3 (1,1)	0,6-7,1 (1,2)
Albumina (g/dL) [§]			
< 3,5	14/31 (45)	14/35 (40)	5/10 (50)
≥ 3,5	17/31 (55)	21/35 (60)	5/10 (50)
Hb (g/dL) [§]			
< 10	13/31 (42)	18/38 (47)	8/10 (80)
≥ 10	18/31 (58)	20/38 (53)	2/10 (20)
Cálcio (mg/dL) (mediana)	5,1-14,2 (9,8)	7,6-12,5 (9,2)	7,4-10,4 (9,4)
Durie e Salmon (estágios) [§]			
Estágio I	4/25 (16)	3/38 (8)	1/10 (10)
Estágio II	1/25 (4)	7/38 (18)	3/10 (30)
Estágio III	20/25 (80)	28/38 (74)	6/10 (60)

* Não houve diferenças significativas entre os grupos

§ número/ número total (%)

Anexo 4- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
 DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO : Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE :
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO : Estudo do efeito epigenético na expressão das QUIMOCINAS SDF-1 E CXCR4 EM CÉLULAS DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO E EM LINHAGENS DE CÉLULAS RPMI 8226 APÓS TRATAMENTO COM TALIDOMIDA.

PESQUISADORA: Estela Maria Novak

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL CRF-8: 10959

UNIDADE DO HCFMUSP: FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE HEMOCENTRO DE SÃO PAULO

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO X RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 02 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Como já informado, você é portador de uma doença chamada Mieloma Múltiplo. Em 50% dos casos esta doença responde ao tratamento com Quimioterapia e nos outros 50% dos pacientes não ocorre esta resposta. Mesmo nos pacientes que responderam inicialmente a doença pode voltar a progredir. O motivo pelo qual este processo ocorre ainda não é totalmente compreendido. Devido a este fato estamos convocando o Sr. (Sra) para participar desta pesquisa.

A presente pesquisa tem como objetivo estudar qual seria o motivo biológico que estaria envolvido na progressão da doença. Para que esta pesquisa possa ser realizada é necessário que o Sr(a) concorde para que possamos utilizar 5 ml do sangue e de 1 ml de medula óssea que já é coletado durante os exames laboratoriais de rotina na avaliação da sua doença e da medula óssea. Cinco ml de amostras de sangue e de 1 ml de medula óssea serão processadas imediatamente para a extração dos ácidos nucleicos, isto é DNA e RNA.

A participação neste estudo não trará nenhum desconforto ou risco esperado além da coleta de sangue e medula óssea que já faz parte da rotina de avaliação laboratorial da sua doença. A sua participação neste estudo será importante, mas não trará nenhum benefício no momento. É importante salientar que o Sr. (a) terá total liberdade de acessar qualquer informação sobre procedimentos que estarão sendo realizados como também dirigir qualquer dúvida. Durante o acompanhamento de sua doença você terá total liberdade de retirar seu consentimento e/ou deixar de participar do estudo, sem que isto traga nenhum prejuízo à continuidade de sua assistência no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As informações obtidas durante a pesquisa terão total sigilo e privacidade.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

O(A) Senhor (a) terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. A liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Caso não queira mais que a amostra do seu sangue seja utilizada para a realização dos testes, terá total liberdade de deixar de participar do estudo. Os resultados dos exames serão guardados de forma sigilosa não tendo risco de exposição a situações constrangedoras. Haverá disponibilidade de assistência no Serviço de Hematologia, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Em caso de dúvidas ou informações sobre a pesquisa, resultados de exames, basta entrar em contato pelo telefone com o Serviço de Hematologia 30615544- r: 339 – Dra. Gracia Aparecida Martinez , médica colaboradora desta pesquisa. Caso ocorra alguma mancha roxa no local da punção ou dor desconfortável, favor entrar em contato com Serviço de Hematologia para receber as devidas orientações através do telefone: 3061-5544. RAMAL: 339 (quarta e sexta-feira, das 9:00 às 16:00 horas). Não haverá indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2008

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo,de 2008.

Sujeito da pesquisa ou responsável

Anexo 5 - Aprovação da CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/05/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0071/08**, intitulado: "**ESTUDO DO EFEITO EPIGENÉTICO NA EXPRESSÃO DAS QUIMOCINAS SDF-1 E CXCR4 EM CÉLULAS DE PACIENTES COM MIELOMA MULTIPLO E EM LINHAGENS DE CÉLULAS RPMI 8226 APÓS TRATAMENTO COM TALIDOMIDA**" apresentado pela **FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Estela Maria Novak**

CAPPesq, 16 de Maio de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

7. Referências

Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, Leleu X, Singha UK, Pitsillides CM, Spencer JA, Kimlinger T, Ghobrial JM, Jia X, Lu G, Timm M, Kumar A, Côté D, Veilleux I, Hedin KE, Roodman GD, Witzig TE, Kung AL, Hideshima T, Anderson KC, Lin CP, Ghobrial IM. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood*. 2007;109(7):2708-2717.

Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res*. 2002;62:7203-7206.

Barillé-Nion S, Barlogie B, Bataille R, Bergsagel PL, Epstein J, Fenton RG, Jacobson J, Kuehl WM, Shaughnessy J, Tricot G. Advances in biology and therapy of multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:248-78

Barlogie B, Zangari M, Spencer T, Fassas A, Anaissie E, Badros A, Cromer J, Tricot G. Thalidomide in the management of multiple myeloma. *Seminars in Hematology*. 2001;38:250-9.

Bataille R, Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Amiot M A cellular model for myeloma cell growth and maturation based on an intraclonal CD45 hierarchy.

Immunol Rev. 2003;194:105-11.

Boissy P, Andersen TL, Abdallah BM, Kassem M, Plesner T, Delaissé JM. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Research.* 2005;65(21):9943-52.

Chng WJ, Ahmann GJ, Henderson K, Santana-Davila R, Greipp PR, Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Kumar S, Rajkumar SV, Lust JA, Kyle RA, Zeldenrust SR, Hayman SR, Fonseca R.. Clinical implication of centrosome amplification in plasma cell neoplasm. *Blood.* 2006 May 1;107(9):3669-75. Epub 2005.

Committee of the Chronic Leukemia-Myeloma Task Force. Proposed guidelines for clinical studies. *Cancer Chemother Rep.* 1968;1:13-6.

D'Amato RJ, Lentzsch S, Anderson KC, Rogers MS. Mechanism of action of thalidomide and 3-aminothalidomide in multiple myeloma. *Semin Oncol.* 2001;28(6):597-601.

Drucker L, Uziel O, Tohami T, Shapiro H, Radnay J, Yarkoni S, Lahav M, Lishner M. Thalidomide down-regulates transcript levels of GC-rich promoter genes in multiple myeloma. *Mol Pharmacol.* 2003;64(2):415-20.

Durie BGM, Salmon SE. The current status and future prospects of treatment for multiple myeloma. *Clin Hematol*. 1982;11:181-210.

Falcão R.P, Dalmazzo LF. O valor da imunofenotipagem para o diagnóstico do mieloma múltiplo e na avaliação da doença residual mínima. *Rev. bras. Hematol. Hemoter*. 2007, 29 (1):3-9.

Franks ME, Macpherson GR, Figg WD. *Thalidomide*. *Lancet*.; 2004 29;363(9423):1802-11.

Garcia A, Cereghini S, Sontag E. Protein phosphatase 2A and phosphatidylinositol 3-kinase regulate the activity of Sp1-responsive promoters. *J Biol Chem*. 2000; 31;275(13):9385-9.

Gazit Y, Akay C. Mobilization of myeloma cells involves SDF-1 /CXCR4 signaling and downregulation of VLA-4. *Stem Cells*. 2004;22:65-73.

Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematolo*. 2002;30:503-512.

Giuliani N, Colla S, Rizzoli V. Angiogenic Switch in multiple myeloma. *Hematology*. 2004;9:377-381.

Giuliani N, Morandi F, Tagliaferri S, Rizzoli V. Targeting pathways mediating bone disease. *Cur Pharm Biotechnol*. 2006;7(6):423-9.

Greipp PR, Lust JA, O'Fallon WM, Katzmann JA, Witzig TE, Kyle RA. Plasma cell labeling index and beta 2 microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood*. 1993;81(12):3382-7.

Gupta D. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia*. 2001;15:1950-1961.

Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*. 1998;91:3-21.

Hayashi T, Hideshima T, Anderson KC. Novel therapies for multiple myeloma . *Br. J. Haematol*. 2003;120:10-17.

Heidemann J, Domschke W, Kucharzik T, Maaser C. Intestinal microvascular endothelium and innate immunity in inflammatory bowel disease; a second line of defense?. *Infect Immun*. 2006;74 (10):5425-32.

Heidemann J, Ogawa H, Rafiee P, Lügering N, Maaser C, Domschke W, Binion DG, Dwinell MB. Mucosal angiogenesis regulation by CXCR4 and its ligand CXCL12 expressed by human intestinal microvascular endothelial endothelial cells. *Am J Physiol.* 2004;286:1059-1568.

Helbig G, Christopherson KW 2nd, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, Broxmeyer HE, Nakshatri H NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem.* 2003;13;278(24):21631-8.

Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, Podar K, Akiyama M, Mitsiades C, Mitsiades N, Gong B, Bonham L, de Vries P, Munshi N, Richardson PG, Singer JW, Anderson KC. Antitumor activity of lysophosphatidic acid acyltransferase-beta inhibitors, a novel class of agents, in multiple myeloma. *Cancer Res.* 2003;63(23):8428-36.

Hideshima T, Chauhan D, Podar K, Schlossman RL, Richardson P, Anderson KC. Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment. *Semin Oncol.* 2001;28(6): 607-12.

Hong X, Jiang F, Kalkanis SN, Zhang ZG, Zhang XP, DeCarvalho AC, Katakowski M, Bobbitt K, Mikkelsen T, Chopp M. SDF-1 and CXCR4 are up-

regulated by VEGF and contribute to glioma cell invasion. *Cancer Lett*; 2006 8;236(1):39-45.

Juffermans NP, Paxton WA, Dekkers PE, Verbon A, de Jonge E, Speelman P, van Deventer SJ, van der Poll T. Up-regulation of HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 on CD4(+) T cells during human endotoxemia and after stimulation with (myco)bacterial antigens: the role of cytokines. *Blood*. 2000; 15;96(8):2649-54.

Klein B, Li XY, Lu ZY, Jourdan M, Tarte K, Brochier J, Claret E, Wijdenes J, Rossi JF.. Activation molecules on human myeloma cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;246:335-41.

Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(9):3530-5.

Kumar S, Witzig TE, Timm M, Haug J, Wellik L, Fonseca R, Greipp PR, Rajkumar SV. Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. *Leukemia*. 2003;17:2025-2031.

Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood*. 2008 15;111(6):2962-72.

Kyle RA. Myeloma and related disorders. In: Wiernik PH, ed. *Neoplastic Diseases of the Blood*. New York: Churchill Livingstone. 385-676. 1985.

Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. *Cancer Res*. 1996;56(20):4625-9.

Lentzsch S, Chatterjee M, Gries M, Bommert K, Gollasch H, Dorken B, Bargou RC. PI3-K/AKT/FKHR and MAPK signaling cascades are redundantly stimulated by a variety of cytokines and contribute independently to proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2004;18(11):1883-90.

Lewis DR, Pottern LM, Brown LM, Silverman DT, Hayes RB, Schoenberg JB, Greenberg RS, Swanson GM, Schwartz AG, Liff JM, et al. Multiple myeloma among blacks and whites in the United States: the role of chronic antigenic stimulation. *Cancer Causes Control*. 1994; 5(6):529-39.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.

Lokhorst HM, Schmidt-Wolf I, Sonneveld P, van der Holt B, Martin H, Barge R,

Bertsch U, Schlenzka J, Bos GM, Croockewit S, Zweegman S, Breitkreuz I, Joosten P, Scheid C, van Marwijk-Kooy M, Salwender HJ, van Oers MH, Schaafsma R, Naumann R, Sinnige H, Blau I, Verhoef G, de Weerd O, Wijermans P, Wittebol S, Duersen U, Vellenga E, Goldschmidt H; Dutch-Belgian HOVON; German GMMG. Thalidomide in induction treatment increases the very good partial response rate before and after high-dose therapy in previously untreated multiple myeloma. *Haematologica*. 2008; 93(1):124-7.

Ludwig H . Advances in biology and treatment of multiple myeloma. *European Society for Medical Oncology* . 2005; 16 Suppl 2:ii106-12.

Luster MI, Simeonova PP. Asbestos Induces inflammatory cytokines in the lung through redox sensitive transcription factors. *Toxicol Lett*. 1998;28:102-103.

Meierhofer C, Dunzendorfer S., Wiedermann CJ. Theoretical basis for activity of thalidomide. *BioDrugs*. 2001;25(10):681-703.

Melchert M, List A.. The thalidomide saga. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(7-8):1489-99.

Möller C, Strömberg T, Juremalm M, Nilsson K, Nilsson G. Expression and

function of chemokine receptors in human multiple myeloma. *Leukemia*. 2003;17(1):203-10.

Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410(6824):50-56.

Murakami H. Multiple Myeloma *Nippon Rinsho*. 2007;65:274-9.

Murdoch C, Monk PN, Finn A. CXC chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine*. 1999;11:704-712.

Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med*. 345(11):833-835. 2001.

Nakayama T, Hieshima K, Izawa D, Tatsumi Y, Kanamaru A, Yoshie O. Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J Immunol* 2003; 1;170(3):1136-40.

Neiva K, Sun YX, Taichman RS. The role of osteoblasts in regulating

hematopoietic stem cell activity and tumor metastasis. *Braz J Med Biol Res.* 2005; Oct;38(10):1449-54.

Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2005; 22;353(25):2654-66.

Palumbo A, Bringhen S, Liberati AM, Caravita T, Falcone A, Callea V, Montanaro M, Ria R, Capaldi A, Zambello R, Benevolo G, Derudas D, Dore F, Cavallo F, Gay F, Falco P, Ciccone G, Musto P, Cavo M, Boccadoro M. Oral melphalan, prednisone, and thalidomide in elderly patients with multiple myeloma: updated results of a randomized, controlled trial. *Blood.* 2008; 27.

Pellegrino A, Ria R, Di Pietro G, Cirulli T, Surico G, Pennisi A, Morabito F, Ribatti D, Vacca A. Bone marrow endothelial cells in multiple myeloma secrete CXC-chemokines that mediate interactions with plasma cells. *Br J Haematol.* 2005;129(2):248-56.

Podar K, Tai YT, Davies FE, Lentzsch S, Sattler M, Hideshima T, Lin BK, Gupta D, Shima Y, Chauhan D, Mitsiades C, Raje N, Richardson P, Anderson KC. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating

multiple myeloma cell growth and migration pain. *Blood*. 2001;98: 428-35.

Podar K, Tai YT, Lin BK, Narsimhan RP, Sattler M, Kijima T, Salgia R, Gupta D, Chauhan D, Anderson KC. Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with $\beta 1$ integrin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC α activation. *J Biol.Chem.* 2002;277(10):7875-7881. Rajkumar SVI. Thalidomide im Multiple Myeloma. *Oncology*. 2000;14(12 Suppl 13):11-6.

Richardson PG, Mitsiades C, Schlossman R, Munshi N, Anderson K. New drugs for myeloma. *The Oncologist*. 2007;2:664-689.

Rohit, Rao C, Krishna G. Effects of captoprill and losartan on thermal and chemical induced pain in mice. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2006;50(2):169-74.

Rosenkilde M., Schwartz T. The chemokine systems-a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS*. 2004;112:481-495.

Sato S, Nojima T, Waki M, Takenaka S. Supramolecular complex formation by beta-cyclodextrin and ferrocenylnaphthalene diimide-intercalated double stranded DNA and improved electrochemical gene detection. *Molecules*.

2005;10(6):693-707.

Singhal, S., Mehta J., Desikan R. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med.* 1999;341:1565-71.

Sirohi B, Powles R, Kulkarni S, Rudin C, Frassoni F, Bacigalupo A, Ainghal S, Vaidya S, Labopin M, Michallet M, Blaise D, Reiffers J, Meloni G, Rio B, Treleavent J, Horton C, Mehta J. Recessing autotransplantation for acute myeloid leukaemia in first remission – a matched pair analysis of autologous marrow vs peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33(12):1209-14.

Stephens TD, Bunde CW, Fillmore BJ. Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:1489-1499.

Trentin L, Miorin M, Facco M, Baesso I, Carraro S, Cabrelle A, Maschio N, Bortoli M, Binotto G, Piazza F, Adami F, Zambello R, Agostini C, Semenzato G. Multiple myeloma plasma cells shows different chemokine receptor profiles at sites of disease activity. *Br J Haematol.* 2007;138(5):594-602.

Ueno T, Hamada N, Ishizaki N, Nakamura N, Kadono J, Fukueda M, Kaieda M, Ooi Y, Yoshida A. case of focal fatty infiltration of hepatic segment IV required

to be distinguished from metastatic liver cancer. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi*. 2000;97(9):1170-5.

Vacca A, Ria R, Semeraro F, Merchionne F, Coluccia M, Boccarelli A, Scavelli C, Nico B, Gernone A, Battelli F, Tabilio A, Guidolin D, Petrucci MT, Ribatti D, Dammacco F. Endothelial cells in the bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood*. 2003;102:3340-3348.

Vacca A, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, Iurlaro M, Ria R, Albini A, Bussolino F, Dammacco F. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*. 1999;93:3064-3073.

Vacca A, Ribatti D, Roccaro AM, Frigeri A, Dammacco F. Bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Seminars in Oncology*. 2001;28:543-550.

Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Hematol*. 1994;87:503-508.

Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia*.

2006; 20(2):193-9.

Vande Broek I, Asosingh K, Vanderkerken K, Straetmans N, Van Camp B, Van Riet I. Chemokine receptor CCR2 is expressed by human multiple myeloma cells and mediates migration to bone marrow stromal cell-produced monocyte chemotactic proteins MCP-1, -2 and -3. *Br J Cancer*.2003;88(6):855-62.

Vande Broek I, Leleu X, Schots R, Facon T, Vanderkerken K, Van Camp B, Van Riet I. Clinical significance of chemokine receptor (CCR1, CCR2 and CXCR4) expression in human myeloma cells: the association with disease activity and survival. *Haematologica*. 2006;91(2):200-6.

Zannettino AC, Paton S, Kortessidis A, Khor F, Itescu S, Gronthos S.. Human multipotential mesenchymal/stromal stem cells are derived from a discrete subpopulation of STRO-1bright/CD34/CD45(-)/glycophorin-A-bone marrow cells.. *Haematologica*. 2007; 92(12):1707-8.