

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIDOR DA ENZIMA 3-METIL-
GLUTARIL COENZIMA A REDUTASE NA VIABILIDADE, CICLO CELULAR
E SÍNTESE DE FATORES DE CRESCIMENTO EM CÉLULAS DE MIELOMA
MÚLTIPLO

PAULA JOSIANE JANOWSKI TROJAN

Ponta Grossa

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UNICENTRO a UEPG)

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIDOR DA ENZIMA 3-METIL-
GLUTARIL COENZIMA A REDUTASE NA VIABILIDADE, CICLO CELULAR
E SÍNTESE DE FATORES DE CRESCIMENTO EM CÉLULAS DE MIELOMA
MÚLTIPLO

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Paula Josiane Janowski Trojan

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero

Ponta Grossa

2012

Ficha catalográfica Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG.

T845a Trojan, Paula Josiane Janowski
Avaliação da atividade de inibidor da Enzima 3- Metil - Glutaril Coenzima a Redutase na viabilidade, ciclo celular e síntese de fatores de crescimento em células de meloma múltiplo / Paula Josiane Janowski Trojan. Ponta Grossa, 2012.
123 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.
Orientadora: Prof. Dr. Giovani Marino Favero

1. Mieloma múltiplo. 2. Estatinas. 3. Ciclo celular. 4. Apoptose. 5. Morte celular. I. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro – Oeste. Mestrado em Ciências Biológicas. II. Fávero, Giovani Marino. III. T.

CDD: 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 14/2012

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **PAULA JOSIANE JANOWSKI TROJAN**.

Aos treze dias do mês de março de dois mil e doze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência do Dr. Giovani Marino Favero, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **PAULA JOSIANE JANOWSKI TROJAN**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Giovani Marino Favero (orientador), Dr. Everson Augusto Krum e Dr^a Viviane Nogaroto Vicari. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato(a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Avaliação da Atividade de Inibidor da Enzima 3-Metil-Glutaryl Coenzima A Redutase na viabilidade, ciclo celular e síntese de fatores de crescimento em células de Mieloma Múltiplo**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de trinta dias**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador(a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim não

Novo título: _____

Ponta Grossa, 13 de março de dois mil e doze.

Prof. Dr. Giovani Marino Favero

Prof. Dr. Everson Augusto Krum

Prof^a Dr^a Viviane Nogaroto Vicari

Ao meu marido, Ivanilso, pelo apoio e
compreensão e ao meu filho, Bruno, que me
ensina todos os dias o sentido das palavras
mãe e amor.

Aos meus pais, Paulo e Cecília, por seus
ensinamentos e amor incondicional e a minha
irmã Daniele, pelo apoio e carinho.

Agradecimentos

Ao meu orientador, prof. Dr. Giovani Marino Favero, que tornou possível a realização deste projeto disponibilizando seu tempo, conhecimentos e dedicação. Obrigado por seus ensinamentos, conselhos, incentivos e, sobretudo paciência.

À professora Dr^a Viviane Nogarotto Vicari pela valiosa colaboração na análise da expressão gênica. Obrigado pela disponibilidade, atenção e carinho.

A todos professores do mestrado em Biologia Evolutiva por compartilharem seus ensinamentos e experiências, em especial a professora Dr^a Henriette Emílio.

Aos colegas Ramon, Paulo e Milton pelo auxílio prestado nos experimentos realizados.

A amiga Dulce Torques Moretti por haver cedido a pravastatina utilizada nos experimentos. Agradeço também seu carinho e amizade. Às amigas Maria Ivete Basniak, Silmara Hennrich, Paloma Hocayen e Kátia Alonso pela amizade e companheirismo.

A direção das Faculdades Integradas Vale do Iguaçu pelo apoio e incentivo e os meus colegas professores das Faculdades Integradas Vale do Iguaçu pela compreensão e auxílio prestado em minhas ausências em sala de aula.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa.

Resumo

O mieloma múltiplo (MM) atinge células plasmáticas completamente diferenciadas, que produzem elevadas quantidades de imunoglobulinas. As alterações genéticas são múltiplas e complexas, afetando a sensibilidade das células tumorais às drogas empregadas e o decurso da doença. A medula óssea constitui o microambiente ideal para progressão da doença, secretando fatores de crescimento imprescindíveis para a proliferação, sobrevivência e migração das células tumorais. Neste trabalho buscou-se avaliar os efeitos da pravastatina, droga inibidora da enzima HMG-CoA reductase, em células de MM, linhagem RPMI 8226. As células foram mantidas em cultura, em meio RPMI, acrescido de 10% de soro fetal bovino, à temperatura de 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após adição da pravastatina ao cultivo celular, em três diferentes concentrações, avaliou-se a proliferação celular, ciclo celular e níveis dos fatores de crescimento em 24, 48 e 72 horas. Os fatores avaliados foram interleucina, Fator de crescimento endotelial, fator de proliferação dos fibroblastos e Fator de transformação β , que influenciam na angiogênese, proliferação celular, metastização e na resposta das células tumorais aos agentes quimioterápicos. Houve uma redução da proliferação celular e acúmulo de células na fase G0/G1 do ciclo celular, sendo que estes efeitos são mais acentuados em concentrações mais elevadas de pravastatina e tempo de contato maior. Ocorreu uma redução dos fatores FGF e VEGF. Os resultados mostram que os efeitos por pravastatina poderia ser benéfico para os pacientes com MM e abrem perspectivas para realização de novos estudos, comprovando seus benefícios e segurança.

Palavras-chave: Mieloma Múltiplo, estatinas, ciclo celular, apoptose, morte celular.

Abstract

The multiple myeloma (MM) reaches plasma cells that are completely different from each other, that produce high amounts of immunoglobulins. The genetic changes are multiple and complexes, affecting the disease course and the sensibility of the tumorous cells to the treatment. The bone marrow constitutes the ideal microenvironment for the disease development, secreting growth factors that are indispensable for the proliferation, survival and migration of tumorous cells. This project is evaluating the pravastatin effect, drug that inhibits the hydroxymethylglutaryl coenzyme reductase (HMG-CoA reductase), in MM cells, from RPMI 8226 line. The cells were kept in RPMI culture media, added by 10% of fetal bovine serum in a temperature of 37°C in atmosphere of 5% of CO₂. After the addition of pravastatin to the cells cultivation, in three different concentrations, cells proliferation, cells cycle and the growth factors were evaluated in 24, 48 and 72 hours. The factors evaluated were interleukin 6, the growth factor of the vascular endothelium, the proliferation factor of fibroblasts and the transformation β factor. They influence in the angiogenesis, cell proliferation, metastasis formation and in the tumorous cells answers to the chemotherapy agents. There was a reduction of the cell availability and cells accumulation in the phase G0/G1 of the cell cycle, and that these effects are more accentuated in higher pravastatin concentration and contact period. A reduction of factors FGF and VEGF has occurred. The results show that the effects provided by pravastatin could be beneficial to patients with MM and there can be perspectives for additional studies to be performed, proving the benefits and safety.

Key Words: Multiple Myeloma, statins; cell cycle; apoptosis; cell death.

Lista de Figuras

- Figura 1** Redução da proliferação de células RPMI 8226 incubadas com diferentes concentrações de pravastatina e avaliadas após 24, 48 e 72 horas..... 79
- Figura 2.1:** Aumento de células na fase G0/G1 do ciclo celular induzido por diferentes concentrações de pravastatina após 24, 48 e 72 horas de tratamento, sendo $p < 0,05$ 80
- Figura 2.2:** Histograma mostrando os efeitos de pravastatina ao longo do ciclo celular, após 24, 48 e 72 horas..... 81
- Figura 3:** Efeito da pravastatina sobre os níveis do fator VEGF, com três diferentes concentrações de pravastatina..... 82
- Figura 4:** Efeito da pravastatina sobre os níveis do fator IL6, com três diferentes concentrações de pravastatina..... 83
- Figura 5:** Efeito da pravastatina sobre os níveis do fator bFGF, com três diferentes concentrações de pravastatina..... 84

Lista de Tabelas

Tabela 1- Quantificação das citocinas presentes no sobrenadante de cultura de mieloma múltiplo imortalizada.....	67
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

AKT – Proto-Oncogene Proteins c-akt; Proteínas Proto-Oncogênicas c-AKT

BAFF – B-cell activating factor; Fator Ativador de Linfócitos B

BMPs – Bone Morphogenetic Proteins; Proteínas Morfogenéticas Ósseas

CCND – Cyclin D; Ciclina D

Cdc42 - cdc42 GTP-Binding Protein; Proteína cdc42 de Ligação ao GTP

COX 2 - Cyclooxygenase-2; Cicloxigenase 2

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay; Ensaio de Imunoadsorção Enzimática

e(NOS) – Endothelial Nitric Oxide Synthase; Óxido Nítrico Sintase Endotelial

ERK – Extracellular Signal-Regulated MAP Kinases; Quinases Reguladas por Sinal Extracelular.

FGF – Fibroblast Growth Factor; Fator de Crescimento de Fibroblastos

FGFR – Receptors Fibroblast Growth Factor; Receptores do Fator de Crescimento de Fibroblastos

FLC – Free Light Chain; Cadeias Leves Livres

FPP – Farnesyl Pyrophosphate; Farnesilpirofosfato

GGPP – Geranylgeranyl Pyrophosphate; Geranilgeranil Pirofosfato

GMSI – Monoclonal Gamopathy of Undefined Significance; Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado

GTP – Guanosine Triphosphate; Guanosina Trifosfato

HGF – Hepatocyte Growth Factor; Fator de Crescimento de Hepatócitos

HIF - Hypoxia Inducible Factor; Fator indutor de Hipóxia

HMG-CoA – 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme reductase; 3-hidroxi-3-metil Glutaril Coenzima A redutase

h-MM – Hyperdiploid Multiple Myeloma; Mieloma Múltiplo com Hiperploídia

IFN γ – Interferon Gama

IGF – Insulin-Like Growth Factor; Fator de crescimento da Insulina

IgH – Immunoglobulin Heavy Chain; Cadeia Pesada da Imunoglobulina

IL – interleukin; interleucina

JAK2 – Janus Kinase 2; Janus Quinase 2

LDH – Lactate Dehydrogenase; Desidrogenase Láctica

LDL – Low-Density Lipoproteins; Lipoproteína de Baixa Densidade

LLC – Chronic Lymphocytic Leukemia; Leucemia Linfocítica Crônica

LOX1 – Lipoxygenase; Lipoxigenase

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase; Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno

MDSC – Myeloid Derived Suppressor Cells; Células Supressoras Derivadas de Células Mielóides

MGUS – Monoclonal Gamopathy of Undefined Significance; Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado

MM – Multiple Myeloma; Mieloma Múltiplo

MIP1 – Macrophage Migration Inhibitory Factor; Proteína Inflamatória dos Macrófagos

NF- κ B – Nuclear Factor kappa B; Fator Nuclear Kappa Beta

nh-MM – Nonhyperdiploid Multiple Myeloma; mieloma múltiplo sem hiperploídia

NIK – NF- κ B-inducing Kinase; Quinase Ativadora do Fator Nuclear κ B

MiRNA – microRNAs

MMP – Matrix Metalloproteinase; Metaloproteinases da Matriz

OLR1 – Low Density Lipoprotein Receptor 1; Receptor para o Colesterol LDL Oxidado

OPG – Osteoprotegerin; Osteoprotegerina

PCR – C Reactive Protein; Proteína C Reativa

PGE2 – Prostaglandin E2; Prostaglandina E2

PI3K – Phosphatidylinositol 3-Kinase; Fosfatidilinositol Quinase 3

PKC – Protein Kinase C; Proteína Quinase C

RANK – Receptor Activator of NF- κ B; Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B

RANKL – Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand; Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B

SCT – Stem Cell Transplantation; Transplante de Células Tronco

SIL-6R – Soluble receptor of interleukin 6; receptor solúvel da interleucina 6

SMM – Smoldering Multiple Myeloma; Mieloma Múltiplo Latente

STAT3 – Signal Transducer and Activator of Transcription; transdutor de sinal e ativação de transcrição 3

TAM – Tumor-associated Macrophages; Macrófagos Associados ao Tumor

TGF β – Transforming Growth Factor Beta; Fator de Crescimento e Transformação Beta

TNF – Tumour Necrosis Factor; Fator de Necrose Tumoral

TRAIL – Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand; Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao Fator de Necrose Tumoral

Tregs – Regulatory T Cells; Células T Regulatórias

VEGF – Endothelial Vascular Growth Factor; Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

VEGFR – Endothelial Vascular Growth Factor Ligands; Receptor do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

Wnt – Wingless Proteins, Proteína Wingless

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
	1.1 MIELOMA MÚLTIPLO.....	15
	1.1.1 Considerações Gerais.....	15
	1.1.2 Microambiente tumoral no MM	21
	1.1.3 Gamopatias monoclonais	23
	1.1.4 Tratamento do MM.....	26
	1.1.5 Alterações genéticas no MM.....	28
	1.2 METABOLISMO ENDÓGENO DO COLESTEROL E CÂNCER	30
	1.3 INIBIDORES DA ENZIMA 3-METIL-GLUTARIL COENZIMA A REDUTASE	32
	1.3.1 Aspectos gerais	32
	1.3.2 Efeitos pleiotrópicos das estatinas	35
	1.3.3 Sensibilidade das células aos efeitos das estatinas	39
	1.4 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER	40
	1.4.1 Interleucina 6 (IL-6)	44
	1.4.2 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)	46
	1.4.3 Fator de crescimento dos fibroblastos (FGF)	49
	1.4.4 Fator de crescimento e transformação β (TGF β)	50
2	OBJETIVOS.....	53
	2.1 OBJETIVO GERAL	53
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
3	MATERIAL E MÉTODOS	54
	3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	54
	3.1.1 Linhagem celular de MM	54
	3.2 REAGENTES	55
	3.3 METODOLOGIAS	55
	3.3.1 Cultivo celular	55
	3.3.2 Viabilidade celular	56
	3.3.3 Avaliação do ciclo celular	57
	3.3.4 Avaliação dos fatores de crescimento	58

4 RESULTADOS	59
CAPÍTULO I: QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS FATORES DE CRESCIMENTO IL-6, TGF-B, VEGF E FGF NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE MM. UMA CORRELAÇÃO COM O MICROAMBIENTE TUMORAL	
CAPÍTULO I I: CO-RELAÇÃO ENTRE METABOLISMO LIPÍDICO, CICLO CELULAR E SECREÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO EM MM.....	71
5 DISCUSSÃO GERAL	91
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1 Introdução

1.1 Mieloma múltiplo

1.1.1 Considerações gerais

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia de plasmócitos que inicia-se na medula óssea (Redzepovic et al, 2008). Caracteriza-se pela proliferação lenta das células tumorais na medula óssea, produção de grandes quantidades de imunoglobulinas e lesões osteolíticas (Kovacs, 2010; Ahn et al, 2008). A expansão clonal dos plasmócitos tumorais na medula óssea ocasiona a produção de elevada quantidade de imunoglobulina monoclonal, geralmente IgG ou IgA, denominadas de proteínas M, e cadeias leves κ ou λ livres na circulação sanguínea (Balakumaran et al, 2011).

O clone neoplásico afeta células B completamente diferenciadas, com potencial replicativo mínimo (Gadó et al, 2001; Ghosh e Matsui, 2009). As células tumorais do MM formam uma população heterogênea, sendo que, algumas destas células, pelos menos em ensaios in vitro, demonstram alta capacidade proliferativa (Zipori, 2010). No entanto, a grande maioria das células tem aparência de células maduras e em estado quiescente. Evidências sugerem que existe uma heterogeneidade funcional, onde apenas uma pequena minoria de células teria potencial de crescimento clonogênico (Huff e Matsui, 2008). As células

tumorais podem ser funcionalmente heterogêneas apesar de se mostrarem aparentemente homogêneas, sendo que, algumas destas células podem ser progenitores malignos com características proliferativas semelhantes às células tronco adultas normais (Ghosh e Matsui, 2009). Indícios sugerem que a maior parte das células tumorais surge em consequência das divisões e diferenciação de uma fração de células tronco cancerosas (CSCs), que parece assemelhar-se a uma população de células B de memória (Basak e Carrier, 2010).

As estimativas mundiais apontam 86000 novos casos de MM por ano, correspondendo a 1% de todos os cânceres e o segundo câncer de sangue mais prevalente (Redzepovic et al, 2008; Taverna et al, 2010). Aproximadamente cinco novos casos de mieloma múltiplo por 100.000 pessoas são diagnosticados a cada ano no mundo, sendo que a maioria das pessoas afetadas encontra-se na faixa etária dos 65 aos 70 anos (Quach et al, 2011). Cerca de 2% dos indivíduos com MM têm menos de 40 anos (Raab et al, 2009). Nos Estados Unidos cerca de 15.000 novos casos são diagnosticados a cada ano (Peng et al, 2011).

O paciente portador de MM apresenta um tempo de sobrevida médio de cinco a dez anos, em pacientes submetidos ao uso de altas doses de quimioterápicos seguido do transplante autólogo de células tronco (Clendening et al, 2004). A sobrevivência média, considerando pacientes submetidos a diferentes esquemas terapêuticos, varia de dois a três anos para pacientes mais idosos (acima de 65 anos) e de cinco a seis anos para pacientes jovens (Bladé et al, 2010). A taxa de sobrevida em cinco anos é inferior a 40% (Decaux et al, 2008). Os

pacientes eventualmente tornam-se resistentes à quimioterapia e morrem devido à progressão da doença ou a toxicidade da terapia (Meinel et al, 2010).

As características clínicas do mieloma incluem elevada produção de imunoglobulinas e fragmentos de imunoglobulina monoclonal, anemia, dor óssea, susceptibilidade a infecções, insuficiência renal, hiperviscosidade do sangue e fraturas patológicas (Gadó et al, 2001). A citopenia nos ossos, a hipercalcemia e as lesões ósseas se devem a infiltração de células do mieloma em toda região medular dos ossos (Schmidmaier et al, 2007). Outras alterações encontradas no MM incluem amiloidose e infecções recorrentes (Richardson et al, 2011). A imunodeficiência humoral e celular com hipogamaglobulinemia, disfunção das células T e granulocitopenia, contribuem para o aparecimento de infecções bacterianas e consequente aumento da morbidade (Hartley-Brown et al, 2010).

O próprio sistema imune, através de células T reguladoras (Tregs = CD4+ CD25 + T) suprime as respostas imunes promovendo o desenvolvimento e progressão do câncer (Lee et al, 2010). Macrófagos associados ao tumor (TAM), células supressoras derivadas de células mielóides (MDSC) e citocinas por elas secretadas, como IL-6 (interleucina 6), TNF (fator de necrose tumoral) e IL-1 β (interleucina-1 β), são essenciais para promover o desenvolvimento do tumor (Zamarron e Chen, 2011).

O MM ocasiona a destruição maciça do esqueleto axial, mediada principalmente pela atividade exacerbada dos osteoclastos. Dor óssea, fraturas, compressão da coluna vertebral e hipercalcemia são sintomas clínicos relacionados às lesões osteolíticas (Labridinis et al, 2009). Entre 70 a 95% dos pacientes

portadores de MM desenvolvem metástases ósseas (Roodman e Dougall, 2008). A avaliação das alterações ósseas no momento do diagnóstico é importante para estabelecer a gravidade da doença. O desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea desencadeia o aparecimento das lesões osteolíticas (Hartley-Brown et al, 2010).

As complicações ósseas se devem ao excesso de atividade dos osteoclastos que são estimulados por vários fatores como o TNF, IL-1, IL-6 (interleucina 6), proteínas inflamatórias liberadas pelos macrófagos, TGF β (fator de crescimento e transformação β), FGF (fator de crescimento dos fibroblastos), entre outros (Sfiridaki et al, 2011; Kwang et al, 2008; Tawara et al, 2011). O aumento da secreção destes fatores decorre da adesão das células neoplásicas ao estroma da medula óssea (Hiruma et al, 2009). Os fatores de crescimento melhoram a sobrevivência das células tumorais, inibem a apoptose das células tumorais e intensificam a diferenciação dos osteoclastos, criando um ciclo vicioso positivo, onde mais fatores de crescimento são liberados estimulando a proliferação tumoral e a destruição óssea (Tawara et al, 2011).

As células do MM incrementam a osteoclastogênese através de MIP-1 (proteína inflamatória dos macrófagos 1) e ligante o RANKL (Receptor Ativador do Fator Nuclear KB) , enquanto suprimem a formação osteoblástica, a partir de seus precursores, pela secreção de antagonistas Wnt (proteína wingless) liberados pelas células do MM, pelo estroma e pelos osteoblastos (Takeuchi et al, 2010).

RANKL é um membro da superfamília de TNF e desempenha um papel importante na osteoclastogênese. Os receptores de RANKL são RANK e OPG (osteoprotegerina), receptor solúvel secretado pelos osteoblastos (Kwang et al, 2008). A interação entre RANKL e seu receptor RANK induz a formação de osteoclastos e a ligação de OPG com RANKL impede a interação RANK-RANKL, limitando a osteoclastogênese (Roodman e Dougall, 2008). O principal responsável pelo aumento da atividade osteoclástica no MM é o desequilíbrio das interações OPG/RANKL (Sfiridaki et al, 2011; Giuliani e Rizzoli, 2008). Elevados níveis de RANKL e a alta relação RANKL/OPG têm correlação com o estadiamento da doença, intensidade da doença óssea, secreção de citocinas angiogênicas e com outros fatores marcadores da atividade da doença, como IL-6, β 2-microglobulina e LDH (desidrogenase láctica) (Sfiridaki et al, 2011). Osteoclastos incrementam sua atividade através da estimulação de várias vias como a via PI3K (via fosfatidilinositol quinase 3) e da MAPK (via da proteína quinase ativada por mitógeno) (Tawara et al, 2011; Hiruma et al, 2009).

O microambiente da medula óssea influencia na ruptura do equilíbrio entre os processos de formação óssea pelos osteoblastos e reabsorção óssea induzida por osteoclastos (Ocio e San Miguel, 2010). Existe uma estreita relação entre células do mieloma, osteoclastos e células endoteliais, originando um ciclo vicioso entre a destruição óssea, angiogênese e expansão do MM (Tanaka et al, 2007).

A insuficiência renal afeta 50% dos pacientes com MM sendo que 20% dos pacientes apresentam alterações renais no momento do diagnóstico (Hartley-Brown et al, 2010). Cadeias leves livres (FLC) são subprodutos da síntese de

imunoglobulinas intactas. Nos pacientes com MM ocorre o aumento da produção de imunoglobulinas e, conseqüentemente, elevação de FLC, responsável pela nefropatia. FLCs podem combinar-se a proteína de Tamm Horsfall ocasionando obstrução do néfron e além de apresentarem citotoxicidade direta sobre as células epiteliais tubulares (Hutchinson et al, 2009). A presença de insuficiência renal no MM está associada a redução a resposta ao tratamento e a menor sobrevida global do paciente quando comparada com pacientes que apresentam função renal normal. O tratamento precoce mostra-se eficaz em cerca de 73% dos pacientes (Dimopoulos et al, 2009). O tratamento inclui agentes quimioterápicos, capazes de reduzir a produção de cadeias leves e técnicas extracorpóreas para remover as cadeias leves circulantes no sangue (Stringer et al, 2011).

O diagnóstico de MM é confirmado pelos exames de hemograma, creatinina sérica, níveis de cálcio, detecção da proteína M no soro e na urina, quantificação de IgG, IgA e IgM, biópsia e aspirado de medula óssea, raio X do esqueleto, determinação da $\beta 2$ microglobulina, Proteína C Reativa (PCR) e lactato desidrogenase (Taverna et al, 2010). A detecção da proteína M no soro, a eletroforese de proteínas na urina, a quantificação de IgG, IgM e IgA e a caracterização das cadeias leves e pesadas através do método de imunofixação são os exames laboratoriais que investigam e caracterizam a produção excessiva de imunoglobulinas (Harousseau e Dreyling, 2010).

A recidiva clínica ocorre quando surgem novos plasmocitomas ou aumento dos já existentes nos ossos ou tecidos moles, hipercalcemia, diminuição da hemoglobina ou aumento da creatinina sérica (Taverna et al, 2010).

1.1.2 Microambiente tumoral no MM

A maioria dos estágios do MM ocorre no ambiente da medula óssea e a disseminação acontece apenas nas fases mais adiantadas da doença. As células tumorais necessitam do ambiente da medula óssea para seu desenvolvimento e dependem dos elementos do estroma para sua sobrevivência (Zipori, 2010; Xiang et al, 2011). A interação entre as células tumorais e o microambiente da medula óssea pode ocorrer pelo contato direto ou através da secreção de citocinas que desencadeiam a ativação de vias de sinalização que proporcionam vantagem proliferativa às células tumorais (Ocio e San Miguel, 2010).

O microambiente da medula óssea é formado por três componentes: o componente celular (células hematopoiéticas e células não hematopoiéticas), componente da matriz extracelular (proteínas fibrosas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos) e o componente solúvel (citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão) (Balakumaran et al, 2011).

O microambiente fornece meios para que as células tumorais tornem-se resistentes ao tratamento através de mecanismos de adesão mediados por citocinas (Zleia et al, 2007; Schmidmaier et al, 2007). A adesão das células do MM às células da medula óssea estromal têm sido relacionadas à secreção aumentada de IL-6, VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), bFGF e a ativação de NF- κ B (fator nuclear- κ B) (Xiang et al, 2011; Abdi et al, 2011).

As interações entre as células do MM, a medula óssea e a proteínas da matriz extracelular contribuem para resistência das células tumorais às drogas (Tancred et al, 2009; Peng et al, 2011). As proteínas da matriz extracelular envolvidas no processo de adesão são o colágeno, fibronectina, laminina e vitronectina entre outras; estas interações são mediadas por receptores presentes na superfície celular como integrinas, caderinas, selectinas e moléculas de imunoglobulinas de adesão celular (Raab et al, 2009).

A composição da matriz extracelular, da medula óssea e do endósteo, quando comparados com controles normais, são aberrantes e a matriz extracelular também possui relevância no processo patológico do MM (Tancred et al, 2009). Osteoclastos, células endoteliais vasculares e células do estroma da medula óssea contribuem para formar um microambiente adequado para o crescimento e sobrevivência das células do MM (Takeuchi et al, 2010; Tancred et al, 2009).

As células tumorais apresentando anormalidades genômicas e epigenômicas promovem alterações em seu microambiente (Fan et al, 2011). O acúmulo de células tumorais na medula óssea e no plasma deve-se a falha no mecanismo de apoptose e a falta de regulação no ciclo celular (Zleia et al, 2007; Peng et al, 2011). Várias moléculas com propriedades anti-apoptóticas e cascatas de sinalização anti-apoptose foram identificadas no MM e contribuem para sobrevivência das células tumorais (Peng et al, 2011). Pacientes com alterações em genes associados à morte celular, nas vias intrínseca e extrínseca da apoptose e dentro das vias TRAIL/TNF/ NF- κ B e vias de sinalização PI3K tendem a apresentar pior prognóstico, com menor sobrevida (Dickens et al, 2010). Pacientes com MM de alto

risco apresentam superexpressão de genes envolvidos na mitose e em processos de vigilância da divisão celular (Decaux et al, 2008).

1.1.3 Gamopatias monoclonais

Acredita-se que MM possa ser precedido de uma multiplicação de plasmócitos na medula óssea, estado este denominado gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) (Zipori, 2010). Em 1960, Waldestrom Jan descreveu a presença de uma estreita faixa de hipergamaglobulinemia na eletroforese, de natureza monoclonal, que denominou de proteína M. Observou ainda que muitos destes pacientes apresentavam MM ou macroglobulinemia enquanto outros não apresentavam evidência alguma de malignidade. A esta última condição denominou hipergamaglobulinemia essencial ou proteína benigna monoclonal (Landgren, 2010; Weiss e Kuehl, 2010).

Na GMSI ocorre a proliferação de células tumorais que se acumulam no microambiente da medula óssea levando a doença óssea progressiva (Zipori, 2010). A GMSI afeta 1% da população adulta, sendo considerada uma condição pré-maligna que, em alguns casos, origina o MM (Gadó et al, 2001). Não existe ainda um marcador confiável capaz de determinar se a GMSI irá ou não originar o MM ou se permanecerá estável (Balakumaram et al, 2011). A GMSI não requer tratamento, apenas acompanhamento clínico (Taverna et al, 2010).

A GMSI é definida pela presença de três critérios: presença de proteína sérica monoclonal abaixo de 3 g/dL; menos de 10% de plasmócitos na medula

óssea e ausência de lesões atribuídas a desordem proliferativa de plasmócitos (Landgren, 2010). O diagnóstico de GMSI geralmente é incidental, realizado por exames que visam avaliar pacientes com sintomas inespecíficos como dores ósseas, fadiga, anemia ou insuficiência renal. Os fatores que ocasionam o surgimento da GMSI permanecem obscuros. Esta condição pode ser resultante de suscetibilidade genética ou exposições ambientais, como a radiação e o uso de pesticidas (Weiss e Kuehl, 2010).

Kyle, em 1980, foi o primeiro a utilizar o termo MM latente (SMM – smoldering MM), para uma condição com a presença dos critérios que caracterizam o MM, mas sem o curso progressivo da doença. O MM oligossintomático (IMM) designa pacientes com dano mínimo nos órgãos comumente afetados pelo MM que não relatam sintomatologia (Landgren, 2010). Investiga-se a possibilidade de tratamento precoce em casos de MM assintomático ou latente (Taverna et al, 2010).

A Clínica Mayo descreve outra alteração denominada MGUS (gamopatia monoclonal de significado indeterminado) de cadeia leve, definida como uma relação anormal das FLC sem a presença de imunoglobulina de cadeia pesada (Weiss et al, 2009). MGUS e MM apresentam quatro alterações gênicas em comum em suas fases precoces: translocações IgH (cadeia pesada da imunoglobulina), hiperploídia associadas com trissomias múltiplas, perda de sequências do cromossomo treze e desregulação do gene que codifica a ciclina D (Chng et al, 2007). Kalushkova e colaboradores (2010) observaram que no MGUS e no MM,

ocorre silenciamento do genes que são alvo das proteínas Polycomb, descritos anteriormente em fibroblastos humanos embrionários.

As alterações genéticas presentes no início do MM e MGUS são, muitas vezes, comuns às duas condições, de modo que a distinção entre MM e MGUS é difícil de ser realizada. Células tumorais de MM em fases avançadas apresentam anormalidades genéticas que raramente são encontradas em MGUS (Weiss e Kuehl, 2010). Portanto, MGUS é um estado pré-leucêmico que pode evoluir para instalação do MM (Ludwig, 2010, Weiss e Kuehl, 2010). A evolução das células de MGUS para MM está associada com surgimento de mutações ativadoras como K-Ras (proteína Ras oncogênica K), N-Ras (proteína Ras oncogênica N) e em FGFR3 (receptor para FGF tipo 3) (Basak e Carrier, 2010).

Cerca de 3% dos indivíduos acima de 50 anos apresentam MGUS. A abordagem preconizada para indivíduos com MGUS consiste no acompanhamento clínico e o monitoramento através dos exames de eletroforese de proteínas na urina, hemograma completo, creatinina sérica e dosagem de cálcio sérico (Weiss et al, 2009).

O Grupo de Trabalho Internacional Myeloma estabeleceu critérios para distinção entre MM latente e doença ativa. A presença de evidências de lesão nos órgãos como hipercalcemia, insuficiência renal, anemia, lesões ósseas, hiperviscosidade sintomática, amiloidose e infecções bacterianas recorrentes indicam a necessidade de tratamento (Raab et al, 2009).

1.1.4 Tratamento do MM

O tratamento e a própria doença ocasionam alterações no sistema renal, imunológico, esquelético, hematológico e nervoso. Estas alterações reduzem a qualidade de vida do paciente, comprometem terapias futuras e podem resultar em mortalidade significativa (Hartley-Brown et al, 2010).

O MM continua a ser uma neoplasia em que a remissão completa ainda não foi possível, apesar do surgimento de novos agentes terapêuticos (Yang et al, 2011). Em 1960 foi introduzido o primeiro tratamento, com uso combinado de melfalano e prednisona (Raab et al, 2009). O tratamento sofreu avanços com uso de altas doses de terapia e o transplante de células tronco, o que aumentou a sobrevida dos pacientes (Hartley-Brown et al, 2010). A descoberta de novos agentes terapêuticos como as drogas imonomoduladoras, talidomida e lenalidomida e inibidores do proteassoma (bortezomib) permitiu uma duplicação no tempo de sobrevida (San-Miguel e Mateos, 2011).

A escolha do tratamento a ser realizado depende da idade do paciente, do estágio da doença e da presença de comorbidades; pode-se optar pelo tratamento de indução com altas doses de quimioterapia, seguido do transplante de células tronco ou então tratamento não intensivo com quimioterapia (Taverna et al, 2010). Vários estudos vêm sendo realizados com intuito de verificar a eficácia de novas combinações de medicamentos como a talidomida, lenalidomida e bortezomib,

melhorando o tratamento de indução, a consolidação ou a terapia de resgate (Giralt, 2011).

O transplante autólogo de células tronco (SCT) é uma medida essencial em pacientes jovens com MM. Com o tratamento de indução convencional a taxa de remissão completa após o SCT é de cerca de 35%; a sobrevida média é de seis anos e, destes 10% alcançam a remissão completa, sobrevivendo mais de dez anos após o SCT autólogo (Bladé et al, 2010). Estudos mostram que altas doses de quimioterápicos associados ao transplante autólogo de células tronco em pacientes jovens, aumentam a sobrevida apresentando maiores vantagens do que o tratamento quimioterápico isolado (Ludwig et al, 2010). Após o transplante autólogo é necessário instituir terapia medicamentosa, com lenalidomida, talidomida ou bortezomib, uma vez que a maioria dos pacientes apresenta recidiva (Giralt, 2011).

O transplante alogênico foi utilizado, mas tem sido abandonado por sua elevada taxa de mortalidade (Basak e Carrier, 2010). A taxa de mortalidade pós-transplante alogênico corresponde de 30 a 50% (Shimoni et al, 2010). O tratamento dos pacientes idosos com MM representa um desafio no sentido de se aumentar a sobrevida dos pacientes reduzindo ao máximo a toxicidade relacionada ao tratamento (Quach et al, 2011). Os novos tratamentos aumentaram a sobrevida média de pacientes jovens, mas para pacientes idosos este aumento não foi significativo (San-Miguel e Mateos, 2011).

A grande maioria dos pacientes apresenta recaída e, desta forma são necessárias novas opções terapêuticas para pacientes refratários ou em recaída (Ocio e San Miguel, 2010). A avaliação do perfil de expressão gênica das células

tumorais e sua conexão com determinadas vias de sinalização é uma nova estratégia na busca por novos agentes terapêuticos (Kalushkova et al, 2010).

1.1.5 Alterações genéticas no MM

As anomalias citogenéticas presentes no MM são complexas e heterogêneas (Peng et al, 2011). Os genomas das células tumorais no MM apresentam alterações estruturais e mutações nos genes, dificultando a investigação da progressão da doença. As anormalidades presentes no mieloma envolvem principalmente deleções em regiões cromossômicas incluindo as deleções del(1p), del (6q), del (8p), del (13q), del (16q) e del (17p) (Walker e Morgan, 2011). Exclusões homozigotas são especialmente relevantes porque contêm genes que serão inativados nos dois alelos. Dentro deste grupo de genes, em pacientes com MM, demonstrou-se a perda recorrente em reguladores negativos da via NF- κ B, exclusão de genes que regulam a morte celular e genes que afetam o estado de metilação da cromatina (Dickens et al, 2010). Mutações responsáveis pela ativação do fator NF- κ B são encontradas em cerca de 17% dos casos de MM e em 40% das linhagens celulares de MM (Demchenko et al, 2010).

O MM pode ser dividido em duas categorias: MM com hiperplóidia (h-MM), quando há presença de muitas trissomias cromossômicas e baixa prevalência de translocações IgH e MM sem hiperplóidia (nh-MM), quando ocorre hipoploidia abrangente e inúmeras translocações IgH (Fonseca et al, 2009). Risco padrão relaciona-se a presença de hiperplóidias, a translocação t (11;14) ou t(6;14), com

β 2-microglobulina baixa e albumina sérica anormal; risco elevado é atribuído a t (4;14), t (14;16), as deleções del17, del13, β 2-microglobulina elevada, cadeia leve ou IgA, insuficiência renal, doença óssea avançada e mieloma extramedular (Richardson et al, 2011).

A heterogeneidade genética no MM dificulta o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pelo surgimento e progressão da doença (Kalushkova et al, 2010). A superexpressão de genes envolvidos nas fases do ciclo celular em pacientes com MM está relacionada com alto risco e doença mais agressiva (Decaux et al, 2008). O painel mínimo para detecção de anormalidades cromossômicas, com intuito de estimar o provável prognóstico, deve incluir t (4;14) (p16;q32); t(14;16) (q32;q23) e deleções 17p13 (Fonseca et al, 2009).

Perfis de expressão aberrante de MiRNA (microRNAs), pequenas moléculas de RNA não codificante que regulam a expressão gênica, tem sido descritos em diversas doenças hematológicas malignas, entre elas o MM (Rushworth et al, 2011).

As alterações genômicas desempenham relevante papel no surgimento de alterações nas expressões gênicas, mas a regulação da transcrição gênica em células B malignas também é afetada pelo microambiente do tumor, ou seja, pelas células endoteliais, osteoclastos, citocinas e outros componentes que fazem parte da matriz extracelular (Nadav-Dagan et al, 2010).

A análise das alterações gênicas tem sido utilizada para dimensionar o risco e, confrontando informações das alterações citogenéticas e a progressão da doença pode-se agrupar melhor os grupos de pacientes com mau prognóstico

(Dickens et al, 2010). As alterações moleculares constituem parte integrante nos processos de tumorigênese, mas a contribuição do próprio microambiente do tumor nas alterações na expressão gênica ainda não foram bem esclarecidas (Nadav-Dagan et al, 2010).

1.2 Metabolismo endógeno do colesterol e Câncer

A compreensão do metabolismo do câncer e sua correlação com o processo de tumorigênese pode contribuir na investigação da etiologia dos tumores e abrir novas perspectivas para seu tratamento (Clendening, 2010). O metabolismo lipídico tem demonstrado propriedades oncogênicas reguladoras nos processos de proliferação, angiogênese e migração das células tumorais (Borgquist et al, 2008). A correlação obesidade/cancer parece ser relevante devido à constatação do grande período de latência entre o aparecimento da obesidade e a instalação do cancer (Lichtman, 2010).

Os dados da American Cancer Society apontam que a obesidade e o sobrepeso podem estar relacionados ao aumento da mortalidade em pacientes com câncer de fígado, câncer de pâncreas, linfoma não Hodgkin e MM (Wolin et al, 2010). Alto risco de câncer também está associada com a obesidade, diabetes tipo II, colesterol alto, e aterosclerose, que são componentes de um estado de doença conhecida como síndrome metabólica (Hirsch et al, 2010).

A obesidade, afrodescendência, exposição prolongada a agrotóxicos têm sido associadas a um risco maior de desenvolver o MM. Não se comprovou se a

suscetibilidade de descendentes africanos se deve a genética, ao nível sócio econômico ou ambos (Landgren et al, 2010). O estudo conduzido por Medina e Krauss (2009), observou diferenças significativas na frequência do alelo A (rs3846662) em americanos/africanos (17,4%) quando comparados a europeus (54-61%) e asiáticos (43-53%). Este alelo codifica a expressão da enzima HMG-CoA redutase (3 metil-glutaril Coenzima A redutase) sem o éxon 13, que demonstrou sensibilidade reduzida às estatinas.

A enzima HMG-CoA redutase catalisa a reação de formação do ácido L-mevalônico, produto intermediário do metabolismo lipídico, que pode estar implicado na etiologia dos tumores; observou-se que a elevação nos níveis de ácido L-mevalônico correlaciona-se a um prognóstico desfavorável no câncer de mama (Clendening, 2010). O colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) atua como ponto central em redes de genes relacionados ao câncer, sugerindo a importância do metabolismo lipídico na transformação celular (Hirsch et al, 2010). A lipoproteína oxidada pode promover processos inflamatórios na parede arterial, ativação de monócitos e macrófagos, elevação na produção de radicais livres e disfunção endotelial (Wang et al, 2008).

A sinvastatina inibe a expressão de OLR1 (receptor para LDL oxidado) em células endoteliais, impedindo a transformação celular que, de alguma forma está relacionada com a inibição da atividade de NF-kB (Hirsch et al, 2010). OLR1 parece estar implicado na relação entre dislipidemia e câncer de mama, porque pode ativar a via NF-kB, reativar a lipogênese e melhorar a adesão e a migração transendotelial (Khaidakov et al, 2011).

A hiperlipidemia é uma complicação raramente observada em pacientes com MM, mas o relatório de Waldestrom sugeria que a proteína M sérica poderia ter papel relevante no desenvolvimento de hiperlipidemia (Fukudome et al, 1996). Níveis elevados de IL-6 e de IL-10 (interleucina dez) são encontrados em indivíduos obesos, sendo que estas citocinas apresentam efeitos proliferativos e antiapoptóticos em plasmócitos (Landgren et al, 2010).

1.3 Inibidores da enzima 3-metil-glutaril – Coenzima A Redutase (HMG-CoA redutase)

1.3.1 Aspectos gerais

Estatinas são inibidores farmacológicos da enzima HMG-CoA redutase, que participa da biossíntese do colesterol, impedindo a conversão de HMG-CoA (hidroximetilglutaril-Coenzima A) em mevalonato (Sassano e Platanius, 2008; Tsubakia et al, 2011; Papadoulos et al, 2011). As estatinas são empregadas em indivíduos com risco cardiovascular devido à sua capacidade de reduzir a LDL oxidada (Kohli e Cannon, 2011, Roy et al, 2011). Esta atividade se deve ao aumento da transcrição do gene que codifica o receptor de LDL levando a sua maior expressão na superfície do hepatócito (Greenwood et al, 2006).

Estatinas atenuam o desenvolvimento da aterosclerose, pois reduzem as propriedades adesivas do endotélio, a resposta inflamatória e o estresse oxidativo. Muitos destes efeitos relacionam-se com aumento da expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e inibição da expressão de LOX-1 (Khaidakova et al,

2011). Após um ano de tratamento com estatinas, observa-se redução significativa, em aproximadamente 15%, na ocorrência de grandes eventos vasculares, como infarto não fatal de miocárdio ou morte por infarto (redução de 13%) e acidente vascular cerebral isquêmico (16%) (Kohli e Cannon, 2011).

A mevastatina foi a primeira estatina isolada em caldos de cultura do fungo *Penicillium citrinum*, após estudo de dois anos onde foram testadas cerca de 6000 cepas microbianas com capacidade de bloquear a síntese de lipídios. A semelhança estrutural entre a mevastatina e o substrato natural da enzima HMG-CoA redutase auxiliou na investigação do mecanismo de ação das estatinas. A mevastatina demonstrou afinidade 10.000 vezes maior pela HMG-CoA redutase que seu substrato natural, demonstrando ser um potente inibidor (Endo, 1992). Os inibidores da enzima HMG-CoA redutase são a segunda classe de medicamentos prescritos nos Estados Unidos, após os analgésicos. Em 2010, aproximadamente 24 milhões de americanos utilizaram estatinas (Roy et al, 2011).

As estatinas de origem natural, mevastatina, lovastatina, sinvastatina e a pravastatina são isoladas do arroz vermelho fermentado e a fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina, rosuvastanina e pitavastatina são compostos sintéticos (Huff e Matsui, 2008). Todas, independentemente de suas diferenças estruturais, ligam-se à enzima HMG-CoA redutase promovendo o deslocamento competitivo do substrato natural HMG-CoA, mas diferem em sua lipofilia, meia vida e potência (Greenwood et al, 2006). Existem relatos de elevação de transaminases hepáticas e casos de miopatia com uso de estatinas (Podhoreka et al, 2010). Efeitos adversos atribuídos as estatinas incluem miopatia, disfunção hepática, insuficiência renal

aguda e catarata. Para insuficiência renal aguda e disfunção hepática o risco foi dose dependente (Hippisley e Coupland, 2010). Os efeitos colaterais mais comuns são leves dores gástricas, elevação de enzimas hepáticas e mialgia que ocorrem em 0,1 a 5% dos pacientes (Murtola et al, 2011). O estudo conduzido por Molokhia e colaboradores (2008) observou que ocorre aumento do risco relativo para miopatia, de 10,6 para cerca de 25,7 após doze meses de uso das estatinas. Os efeitos adversos das estatinas foram quantificados em estudo realizado no Reino Unido, após acompanhamento de seis anos de indivíduos em uso de estatinas. Relatou-se que os efeitos adversos parecem ser comuns a todas as estatinas, exceto para a disfunção hepática, onde a fluvastatina proporcionou riscos mais elevados (Hippisley-Cox e Coupland, 2010). Os efeitos colaterais mais prevalentes no estudo conduzido por Van der Spek (2006) foram fadiga, náuseas, diarreia e neutropenia em pacientes com MM refratários que tiveram o tratamento quimioterápico suplementado com sinvastatina por sete dias.

Os primeiros modelos animais sugeriam que as estatinas poderiam apresentar efeito pró-tumorigênico, porém estudos mais recentes apontam para um efeito preventivo e, nos casos de câncer já instalado, indução a apoptose e inibição da proliferação celular (Boudreaux, 2011). Pesquisas têm demonstrado indução à apoptose de células tumorais, inclusive no MM (Wong et al, 2007).

Pesquisas indicam que a enzima HMG-CoA redutase pode desempenhar um papel relevante nos tumores humanos (Clendening, 2010; Borgquist et al, 2008). A enzima HMG-CoA redutase é a enzima limitante na síntese do colesterol endógeno, sendo um foco regulatório primário. Vários mecanismos, mediados por esteróis e

isoprenóides exercem controle de feedback sobre esta enzima. Um dos mecanismos para o controle da enzima redutase consiste na degradação da enzima a partir de membranas do retículo endoplasmático. O acúmulo de esteróis nestas membranas promove a ligação com proteínas denominadas Insig ER-1 e Insig-2 que recrutam uma ligase gp78, promovendo a ubiquitinação da redutase e consequente destruição através de mecanismo ainda não completamente conhecido (DeBose-Boyd, 2010).

1.3.2 Efeitos pleiotrópicos das estatinas

A inibição da enzima HMG-CoA redutase ocasiona a redução intracelular dos produtos finais da via do metabolismo lipídico, promovendo a ativação de fatores de transcrição citoplasmáticos que, entre outros efeitos, provocam a transcrição de vários genes, essenciais para a proliferação e sobrevivência celular (Zipori, 2010). Estatinas vêm sendo investigadas em diversos tipos de câncer como colorretal, de mama, pulmão próstata, pâncreas e também neoplasias do tecido hematopoiético como leucemias mielóides agudas, leucemias linfocíticas agudas e MM (Sassano e Platanias, 2008; Roy et al, 2011).

Estatinas apresentam efeitos pleiotrópicos ou secundários, abrindo a perspectiva de sua aplicação no tratamento de outras doenças, inclusive neoplasias (Huff e Matsui, 2008; Wang et al, 2008). Estes efeitos são independentes da redução do colesterol LDL (Greenwood et al, 2006). Acredita-se que a redução da síntese de isoprenóides seja o principal efeito pleiotrópico atribuído às estatinas.

Isoprenóides são partes de lipídios confinados na parte interna das células, que regulam a modificação pós-transducional de várias proteínas (Papadopoulus et al, 2011; Wang et al, 2008).

Os produtos finais da biossíntese de colesterol incluem os esteróis, envolvidos na integridade da membrana celular e produção de esteróides; ubiquinona (Coenzima Q), envolvidas no transporte de elétrons e respiração celular; isoprenóides farnesil e geranil, envolvidos na função de proteínas intracelulares; dolicol, necessário na síntese de glicoproteínas e isopentenildelamina, essencial na síntese de proteínas (Klawitter et al, 2010). A proliferação, invasão e angiogênese de células tumorais de várias linhagens estão sob controle de várias proteínas isopreniladas, o que torna possível a aplicação terapêutica das estatinas no câncer (Riganti et al, 2011).

A redução dos isoprenóides e, conseqüentemente, da ativação de proteínas sinalizadoras intracelulares como Rho, Ras e Cdc42 são alguns destes efeitos secundários (Wang et al, 2008). Foi proposto que a interferência nas proteínas Ras e Rho, que medeiam o mecanismo de apoptose, poderiam ser responsáveis pela redução da sobrevivência das células tumorais induzida por estatinas (Wong et al, 2007). A redução na síntese de farnesilpirofosfato (FPP) e geranilgeranil pirofosfato (GGPP), elementos responsáveis pela reação de isoprenilação, impede a ligação covalente destes isoprenóides com proteínas celulares, como oncoproteínas (Ras), proteínas nucleares (lamininas), guanosina trifosfato (GTP) e proteínas de ligação (Rho – membro da família Ras que controla organização de actina e estruturas de adesão, Rac – membro da família Ras, Rab – família de GTPases que controla o

transporte de vesículas) (Gauthaman et al, 2009; Wang et al, 2008; Ghosh-Choudhury et al, 2010). A isoprenilação é uma modificação pós transducional fundamental para a transdução de sinal, necessário para os processos de proliferação, diferenciação e morte celular (Herrero-Martin e Lopez-Rivas, 2008; Gauthaman et al, 2009; Peng et al, 2011).

A isoprenilação de proteínas modifica a sua localização na parte interna da membrana celular, promovendo efeitos marcantes sobre o crescimento celular (Ghosh-Choudhury et al, 2010). O ancoramento destas proteínas à membrana celular é essencial para sua função biológica (Kidera et al, 2010; Herrero Martins e Lopez-Rivas, 2008). A isoprenilação de RhoA (membro da família de GTPases) é imprescindível para ativação de proteínas do citoesqueleto associadas a RhoA, cuja função consiste em redistribuir os microfilamentos de actina durante adesão ao substrato ou nas interações célula a célula (Musso et al, 2011). Cafforio et al (2005), observaram que a adição dos isoprenóides após o uso de estatinas em células em cultura, resgatou a viabilidade celular e a adição de esqualeno não teve o mesmo efeito, enfatizando o papel dos compostos isoprenóides no mecanismo de apoptose celular.

Alguns efeitos das estatinas são atribuídos ao esgotamento de jangadas lipídicas, domínios da membrana ricos em colesterol que atuam como pontos centrais nos mecanismos de transdução de sinais (Musso et al, 2011). Estes locais são ricos em receptores de superfície e de membrana onde se ligam moléculas sinalizadoras como Ras. A redução na produção de dolicol, derivado do colesterol,

reduz a N-glicosilação de polipeptídeos recém sintetizados no retículo endoplasmático (Vaklasava et al, 2011).

Evidências sugerem que as estatinas também exercem efeitos benéficos sobre processos inflamatórios, podendo atuar como agentes antiinflamatórios através da inibição direta da expressão de genes inflamatórios (Wanga et al, 2011). As estatinas podem reduzir a expressão de macrófagos, do TNF e da IL-1 β e inibem a proliferação de células mononucleares no sangue periférico (Wang et al, 2008). Reduzem a resistência à quimioterápicos devido a inibição da desacetilação das histonas e redução na síntese de colesterol (Vaklasava et al, 2011).

Têm-se atribuído às estatinas efeitos de imunomodulação e proteção contra senescência celular (Wang et al, 2008). Estatinas interferem na função das células T e das células apresentadoras de antígenos, demonstrando propriedades imunomoduladoras, podendo influenciar no desenvolvimento de doenças autoimunes. Em 1997 Pahan et al verificaram que o tratamento in vitro com lovastatina de macrófagos do Sistema Nervoso Central, células da micróglia e astrócitos, inibe a expressão do fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1) (Greenwood et al, 2006). Observou-se que o risco de câncer colo retal é 1,9 vezes maior em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais e que o uso de estatinas por períodos prolongados proporciona a redução deste risco (Sammader et al, 2011).

1.3.3 Sensibilidade das células aos efeitos das estatinas

A variação inter individual na resposta às estatinas tem sido atribuída a fatores genéticos e não genéticos, entre eles as isoformas resultantes do splicing alternativo da enzima HMG-CoA redutase como sugere o estudo de Medina e Krauss (2010). Existem duas isoformas da enzima HMG-CoA redutase, devido ao splicing alternativo; a full-length HMGCR (HMGCR-FL) e outra versão da enzima sem o éxon 13 (HMGCR-D13). O exon treze codifica uma região no domínio catalítico da enzima que apresenta resíduos importantes para ligação dos substratos e das estatinas (Clendening et al, 2010). Os haplótipos HMG-CoA redutase mostram uma pequena percentagem de respostas atenuadas às estatinas e seu estudo pode conduzir à descoberta de algum mecanismo geneticamente regulado que interfere na resposta terapêutica do indivíduo às estatinas (Medina, 2010).

As avaliações das estatinas na leucemia mielóide aguda e mieloma múltiplo têm demonstrado que a eficácia das estatinas restringe-se a um subconjunto de células tumorais altamente responsivo. Em seus estudos Clendening e colaboradores (2010) demonstraram que a desregulação na via do metabolismo lipídico é um fator determinante na sensibilidade à apoptose induzida pelas estatinas.

1.4 Mediadores inflamatórios e sua correlação com o câncer

Estima-se que 15 a 20% das mortes relacionadas ao câncer podem ser atribuídas a condições inflamatórias ou infecciosas. Rudolf Virchow, no século XIX, observou a presença de leucócitos nos tumores, fornecendo o primeiro indício da correlação inflamação e câncer. As moléculas inflamatórias encontram-se elevadas em muitos tipos de cânceres, indicando uma correlação entre citocinas e proliferação de células tumorais. As respostas inflamatórias influenciam diferentes etapas do desenvolvimento tumoral, incluindo iniciação, promoção, transformação maligna, invasão e metástase (Grivennikov et al, 2010).

Esclarecer os vínculos moleculares e celulares que estabelecem a relação entre inflamação e câncer abre novas perspectivas para novas aplicações terapêuticas para drogas anti-inflamatórias (Coimbra et al, 2010). Estudos clínicos e epidemiológicos buscam evidenciar a correlação doenças inflamatórias e metabólicas e o câncer. Várias vias de sinalização estão implicadas no câncer e também em doenças inflamatórias como por exemplo o fator de transcrição NF- κ B (Hirsch et al, 2010).

Evidências sugerem que a resposta inflamatória crônica desregulada pode desencadear várias doenças crônicas, entre elas o câncer (Aggarwal e Gehlot, 2009). No início do processo tumoral macrófagos associados ao tumor (TAM) M1 são ativados por mediadores inflamatórios, infiltram-se no tumor e secretam quimiocinas e citocinas, como IL-6 e TNF α , induzindo a resposta pró-inflamatória.

Macrófagos M2 associados ao tumor surgem nas fases mais avançadas da doença e secretam fatores que inibem a imunidade contra o câncer, como TGF β 1 e IL-10. A subpopulação de células Tregs inibe a ativação de células T CD4 e TCD8 e, dentro do microambiente do tumor podem suprimir a resposta imune anti-câncer (Zamarron e Chen, 2011).

Receptores Toll-like, presentes em células apresentadoras de antígenos, podem ativar o fator NF-kB levando a expressão de genes envolvidos na imunidade inata e adaptativa, promovendo a proliferação e sobrevivência de células, respostas a stress celular, apoptose e anti-progressão do câncer; sendo assim, é possível que estes receptores possam contribuir evitando ou favorecendo a progressão tumoral (Abdi et al, 2011). Células do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos, estão presentes no microambiente do tumor e secretam diversos fatores de crescimento e citocinas capazes de estimular a proliferação de células tumorais (Grivennikov et al, 2010). Demonstrou-se que a elevação das citocinas pró-inflamatórias em pacientes com câncer reflete em um aumento de risco de morte, devido a relação das citocinas com o crescimento tumoral. No estudo holandês PROSPER observou-se que indivíduos que produzem elevadas quantidades de citocinas inatas, IL-6, TNF e IL-1 β , apresentam maior risco de mortalidade por câncer (Trompet et al, 2009). Hirsch et al (2010), mostraram o envolvimento de várias citocinas como IFN γ (interferon gama), IL-1 β e IL-6 no processo de transformação das células tumorais.

A estreita relação entre NF-kB, imunidade inata e controle do crescimento celular permanece conservada desde os primeiros dias da multicelularidade. Caso

a infecção seja sanada, a resposta inflamatória cessa sem alterações teciduais, mas repetidas infecções podem resultar em perda tecidual e consequente resposta inflamatória prolongada que, na tentativa de reparo tecidual pode ocasionar crescimento anormal (Ben-Neriah e Karin, 2011).

Tumores de pacientes com MM e linhagens celulares de MM exibem altos índices de ativação do fator nuclear kB (NF-kB) (Thu e Richmond, 2010). Em células tumorais várias alterações moleculares interferem na regulação da ativação de NF-kB e, neste caso, ao invés da ativação transitória fisiológica, NF-kB torna-se constitutivamente ativado (Sethi et al, 2008).

NF-kB é um fator de transcrição presente em todas células do organismo e ativa diversas vias inflamatórias que conduzem à expressão de produtos de genes relacionados a transformação celular, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase no câncer (Aggarwal e Gehlot, 2009). Fatores da família Rel/NF-kB em vertebrados são formados por cinco proteínas celulares cRel, RelA, RelB, p50/p105, e p52/p100 (Sethi et al, 2011). A regulação é realizada por duas vias: a via canônica, mediada pelo inibidor do complexo da quinase kB, é ativada por várias citocinas; a via não canônica pode ser ativada apenas por alguns ligantes como CD40 ligante, fator de ativação das células B (BAFF) (Thu e Richmond, 2010).

Mutações envolvendo NFkB são encontradas em 17% dos pacientes com MM (Demchenko et al, 2010). Alterações genéticas e epigenéticas que promovem a estabilização de NIK (quinase ativadora de NF-kB), mutações inativadoras nos reguladores negativos de NIK, mutações ativadoras nos reguladores positivos de

NIK e translocações cromossômicas ou ampliações do gene podem aumentar a expressão de NIK promovendo a ativação de NF- κ B no MM (Thu e Richmond, 2010). Portanto, a ativação constitutiva de NF- κ B também tem sido relacionada à expressão elevada de NIK (Aggarwal e Gehlot, 2009; Ben-Neriah e Karin, 2011). No MM a ativação constitutiva de NIK desencadeia a ativação da via clássica (canônica) e alternativa (não canônica) de NF- κ B (Ben-Neriah e Karin, 2011).

A expressão desregulada dos genes controlados por NF- κ B pode promover também a expressão elevada de genes antiapoptóticos, melhorar a resistência das células tumorais as drogas quimioterápicas (Rushworth et al, 2011), bem como alterar a expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, como por exemplo da ciclina D1 (Sethi et al, 2008).

Huff e Matsui (2008), avaliaram a capacidade das estatinas naturais e sintéticas para inibir a ativação do NF- κ B em células de Leucemia mielóide humana (linhagem KBM-5). As estatinas naturais inibiram a ativação do NF- κ B via TNF e, na fase posterior do estudo, testou-se a atividade da sinvastatina em conjunto com agentes quimioterápicos, e se observou a potencialização da apoptose induzida pelos agentes quimioterápicos. Kwang et al (2008), relataram que a redução da ativação de NF- κ B induzida pela sinvastatina impede a ativação de RANKL, através da supressão da fosforilação de I κ B α , sua degradação e a redução da atividade de quinase I κ B α (complexo quinase α β), impedindo a formação de osteoclastos.

Vários fatores de crescimento que medeiam a proliferação celular, como TNF- α , IL-1 β e IL6 são regulados por NF- κ B. As citocinas secretadas ativam vias de

sinalização como: ERK (sinal extracelular regulado pela quinase); Janus quinase 2 (JAK2) / STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3); fosfatidilinositol quinase 3 (PI3K) / AKT (proteína quinase B) e NFκB (Peng et al, 2011). Os fatores de transcrição NF-κB e STAT3 parecem ser dois elos fundamentais em um ciclo que promovem retroalimentação positiva, favorecendo a progressão do tumor. Em um modelo experimental de indução, a transformação celular dependente de NF-κB induziu a inflamação ocasionando o aumento da secreção de IL-6, que por sua vez ativa a via STAT3. Neste modelo a IL6 promoveu ativação maior de NF-κB fechando um ciclo de feedback positivo (Zamarron e Chen, 2011).

1.4.1 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6, em condições normais, apresenta níveis séricos baixos ou indetectáveis; eleva-se em condições fisiológicas (stress, dieta, exercício físico) e em resposta à lesão, inflamação e infecção (Ara e DeClerck, 2010). A elevação da IL-6 em pacientes com MM, indicada pelo aumento da Proteína C Reativa está presente em 37% dos pacientes no momento do diagnóstico e correlaciona-se a agressividade da doença e prognóstico desfavorável (Aggarwal e Gehlot, 2009). Pacientes transplantados mostram níveis mais elevados de IL-6 e IL-8 quando comparados a pacientes não submetidos a transplante (Caoa et al, 2010).

A IL-6, produzida pelas células do estroma, é apontada como um dos principais contribuintes para a sobrevivência das células do MM e seu crescimento no microambiente da medula óssea. Estudos que demonstram a falta de

crescimento do plasmocitoma em ratos com deficiência de IL-6 apoiam esta teoria (Zipori, 2010). Esta citocina ocasiona múltiplos efeitos na progressão tumoral, resultantes da ação direta sobre as células tumorais e também da sua atividade sobre células que constituem o microambiente tumoral, especialmente osteoclastos, osteoblastos, células endoteliais e células do sistema imune (Ara e DeClerck, 2010).

Os efeitos da IL-6 são mediados através da ligação com receptores denominados IL-6R α e IL-6R β . A IL-6 apresenta dois mecanismos de regulação: autócrina e parácrina. Na regulação autócrina a citocina é produzida endogenamente, atuando diretamente nos receptores e na regulação parácrina a IL-6 que atua nos receptores é exógena (Kovacs, 2010). A IL-6 é secretada pelas próprias células do mieloma (autócrina) e também pelas células do estroma da medula óssea (Gadó et al, 2001). Níveis elevados de IL-6 e seu receptor solúvel sIL-6R têm sido associados com resultados clínicos desfavoráveis em vários cânceres humanos, incluindo o MM (Ara e DeClerck, 2010).

A interação da IL6 com seu receptor ativa a família de quinases Janus (JAK1, JAK2 e TYK2) ligada ao domínio citoplasmático de transdução de sinal gp130 que, por sua vez ativam a transcrição de STAT3 (Ara e DeClerck, 2010). Membro da família STAT, o STAT3, é ativado em mononucleares da medula óssea de pacientes com MM; esta ativação é importante para a sobrevivência das células de mieloma e contribui para inibição da apoptose (Gadó et al, 2001). A ativação de JAK/STAT promove a expressão de RANKL de osteoblastos e células do estroma que estimulam a formação e a atividade de osteoclastos ocasionando a destruição

óssea (Tawara et al, 2011). A IL-6 também estimula a produção de prostaglandina E2 (PGE2) que atua como mediador de ativação de osteoclastos. A ligação da IL-6 com seu receptor ativa também as vias MAPK e PI3K. A IL-6 ativa também diversas vias que apresentam atividade pró-tumorigênica, como a ciclooxigenase (Cox-2), Wnt, TGF β e NF-kB (Ara e DeClerck, 2010).

1.4.2 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

A angiogênese é um evento essencial no desenvolvimento MM e este processo é controlado por fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos, resultando no desenvolvimento de novos vasos capilares a partir de vasos pré-existent (Valckenborgh, 2002; Dong et al, 2007; Yang, 2011). As próprias células do MM produzem fatores de crescimento que estimulam a angiogênese, como VEGF, bFGF e HGF (fator de crescimento dos hepatócitos) (Redzepovic et al, 2008). Geralmente os mediadores angiogênicos, VEGF, FGF e TNF α , encontram-se elevados em pacientes com MM e, às vezes correlacionados entre si (Greco et al, 2009). Os fatores angiogênicos também são secretados por células do estroma, células endoteliais, células inflamatórias e matriz extracelular (Dong et al, 2007). Estatinas exercem efeitos bifásicos, podendo exercer efeitos pró-angiogênicos ou anti-angiogênicos, de acordo com a dose administrada e as características das células tumorais. Pequenas doses proporcionam efeitos anti angiogênicos e, doses altas, o efeito contrário (Papadopoulus et al, 2011).

Níveis elevados de VEGF são encontrados em muitos soros de pacientes com câncer, produzidos pelas próprias células tumorais (Huang et al, 2007). O VEGF é importante na angiogênese normal e patológica, sendo capaz de aumentar a permeabilidade vascular e apresenta efeito mitógeno específico nas células endoteliais (Valckenborgh, 2002; Greco et al, 2009). A expressão de VEGF é regulada por vários fatores como interleucinas (IL-6, IL-10 e IL-1 β), fator de crescimento de fibroblastos e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) (Greco et al, 2009).

Receptores de VEGF também são expressos em células hematopoiéticas, que após estímulo induzido por citocinas, são capazes de secretar VEGF (Huang et al, 2007). O gene codifica pelo menos cinco isoformas de VEGF que se encontram ancoradas à matriz extracelular através dos domínios de ligação da heparina (Greco et al, 2009).

Tem sido evidenciado que as células do MM são capazes de secretar VEGF em resposta à secreção de IL-6 e que, em resposta a secreção de VEGF as células endoteliais e do estroma da medula óssea também podem secretar IL-6, um importante fator para o crescimento das células malignas; estes eventos caracterizam um ciclo parácrino (Medinger et al, 2010).

O VEGF é considerado um dos principais fatores atuantes no processo de vascularização do tecido ósseo. O aumento da vascularização, em conjunto com os componentes do microambiente da medula óssea que favorecem a proliferação das células tumorais, bem como as interações entre as células do MM e os osteoclastos, são processos muito importantes na patogênese do MM (Sfiridaki et

al, 2011). O VEGF contribui para formação de novos vasos mobilizando ativamente células progenitoras endoteliais, ocasionando angiogênese anormal no tumor que, por sua vez, favorece o crescimento do tumor e o surgimento de metástases (Yang et al, 2011). Células endoteliais e seus progenitores foram identificadas no sangue periférico de pacientes com câncer, inclusive no MM. O número destas células parece estar diretamente relacionado com a gravidade da doença (Chen et al, 2009). O VEGF também aumenta a permeabilidade vascular e as moléculas de adesão nas células endoteliais (Dong et al, 2007).

Aumento de VEGF, produzido pelas células do MM, e da osteopontina secretada pelos osteoclastos, interagem entre si promovendo maior angiogênese que se deve, em parte, ao aumento da migração e sobrevivência das células endoteliais (Tanaka et al, 2007). No MM VEGF e FGF são secretados pelas células do mieloma e, seus níveis são mais elevados na doença avançada (Valckenborgh, 2002). Estudos sugerem que o VEGF em conjunto com a osteopontina, que é uma proteína não colágena da matriz, agem em cooperação reforçando a angiogênese. Níveis séricos mais elevados de osteopontina foram observados em pacientes em estágios avançados de MM (Sfiridaki et al, 2011).

O VEGF liga-se e ativa seus dois receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, sendo que, este último tem sua função na angiogênese tumoral completamente esclarecida, porém a função de VEGFR-1 não foi bem definida. O receptor VEGFR2 é expresso em macrófagos de animais portadores de tumor, constituindo o receptor mais ativo na quimiotaxia induzida por VEGF. O mesmo estudo observa

que o VEGFR1 é capaz de estimular a migração de neutrófilos *in vitro* (Roland et al, 2009).

Angiopietina e VEGF ativam enzimas, como o fator ativador de plasminogênio e metaloproteinases da matriz (MMP) que ocasionam a degradação da matriz extracelular favorecendo a migração de células endoteliais (Fan et al, 2011). Portanto, a degradação da matriz extracelular é essencial para invasão e formação de metástase (Dong et al, 2007).

Os principais estímulos angiogênicos são decorrentes da hipóxia e do VEGF mas, outras citocinas, como IL-1 β , IL-6 e TNF α também podem induzir a angiogênese (Roland et al, 2009). Fatores de transcrição chamados de Hipóxia induzida por fatores (HIFs) se ligam ao promotor de VEGF quando existe hipóxia, promovendo aumento na transcrição de RNAm (RNA mensageiro) de VEGF (Dong et al, 2007).

1.4.3 Fator de crescimento de fibroblastos

O fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) é produzido principalmente pelas células de origem mesenquimal e, em conjunto com o VEGF, regula a angiogênese *in vivo* e *in vitro* (Greco et al, 2009). Vários estudos demonstraram que a sinalização FGF ocasiona a proliferação das células tumorais (Turner e Grose, 2010). Os fatores FGF pertencem a um grande grupo de fatores de crescimento responsáveis pelo controle de diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração celular durante o processo

embrionário e atuam na manutenção da homeostase celular (Hadari e Schlessinger, 2009; Qing et al, 2009).

O bFGF (fator básico de crescimento dos fibroblastos) liga-se a quatro diferentes receptores tirosina quinase (FGFR1-4) de alta afinidade estimulando a proliferação de células endoteliais in vitro (Greco et al, 2009). Os efeitos na proliferação celular, angiogênese e migração celular decorrem da ativação das vias MAPK e PKC (proteína quinase C) através da ligação do bFGF com seus receptores (Turner e Grose, 2010).

A translocação cromossômica t (4; 14) (p16.3; q32) promove a superexpressão em FGFR3 em 20% dos doentes com mieloma múltiplo e está relacionada com a diminuição da resposta clínica e menor sobrevida do paciente (Hadari e Schlessinger, 2009; Qing et al, 2009). Observou-se uma tendência à redução de bFGF quando indivíduos respondedores e não respondedores ao MM são comparados (Greco et al, 2009).

1.4.4 Fator de crescimento e transformação beta (TGF β)

A superfamília dos TGF β é formada por diversas proteínas, incluindo TGF β , proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), citocinas e fatores de crescimento peptídicos (Ma e Ma, 2011). Experimentos apontam que o estroma protege células tronco para que se mantenham no estado indiferenciado através da atividade dos membros do fator de crescimento e transformação (TGF) da família β , cujos efeitos são antagonistas da diferenciação (Zipori, 2010). A via de sinalização TGF β exerce

dupla atividade nos cânceres; inicialmente inibe a formação tumoral, mas nas fases posteriores, quando o tumor está estabelecido, os níveis elevados de TGF β promovem o crescimento, progressão e o surgimento de metástases (Hempel et al, 2008).

O fator de crescimento transformador β (TGF- β) possui atividade reguladora sobre a hematopoiese. A expressão do receptor tipo III do TGF β (T β RIII) encontra-se reduzida ou perdida na maior parte das espécies de MM (Lambert et al, 2011). Resultados apontam que a perda de expressão de T β RIII no curso do MM contribui para a progressão da doença, influenciando no crescimento, multiplicação, motilidade e aderência das células neoplásicas (Lambert et al, 2011). O efeito final de TGF β em células do sistema imune depende do microambiente tumoral e das citocinas secretadas. Em geral, admite-se que TGF β é uma citocina imunossupressora (Zamarron e Chen, 2011).

As próprias células tumorais no MM produzem várias citocinas e quimiocinas que podem ser utilizadas como marcadores diagnósticos e prognósticos e potenciais alvos para novas terapias anti-cancer (Caoa et al, 2010). O MM continua a ser uma neoplasia onde a remissão completa ainda não foi atingida e novos agentes terapêuticos devem ser pesquisados visando melhorar a expectativa de vida dos pacientes. Esta pesquisa buscou evidenciar os efeitos da pravastatina sobre as células de mieloma múltiplo, linhagem RPMI 8226, in vitro, baseada nos efeitos das estatinas relatados em vários estudos científicos já realizados, com várias neoplasias, inclusive no MM. As estatinas reduzem a proliferação celular e induzem as células tumorais ao aprisionamento na fase G0/G1 do ciclo celular e

reduzem de secreção de mediadores inflamatórios. A comprovação destes efeitos pode credenciar a utilização da pravastatina no tratamento do MM, como monoterapia ou adjuvante em esquemas terapêuticos.

2 Objetivos

Considerando que o MM é a segunda neoplasia hematopoiética mais freqüente, cuja remissão completa ainda não foi possível, torna-se relevante descobrir novos agentes terapêuticos buscando proporcionar melhoria na sobrevida destes pacientes. A compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à doença contribui para descoberta de novos alvos terapêuticos e, conseqüentemente de drogas a serem utilizadas em monoterapia ou em esquemas terapêuticos no MM.

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da pravastatina sobre a viabilidade celular, ciclo de duplicação celular e secreção de fatores de crescimento.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o efeito da pravastatina sobre a viabilidade celular das células de mieloma múltiplo.
- Investigar o ciclo celular em células de mieloma múltiplo tratadas com pravastatina.
- Determinar as alterações nas concentrações das citocinas após exposição à pravastatina.

3 Material e Métodos

3.1 Material Biológico

3.1.1 Linhagem celular de Mieloma Múltiplo - RPMI 8226:

A linhagem RPMI 8226 é constituída por células de mieloma múltiplo, oriunda de sangue periférico que foi estabelecida em 1966 por Moore e Kitamura no Roswell Park Memorial Institute (Moore e Kitamura, 1968). Esta linhagem ocorreu espontaneamente sem infecção in vitro pelo vírus de Epstein Baar. A linhagem é bem documentada com considerável estabilidade genética. Apresenta características fenotípicas de células linfoplasmocitárias, com alto grau de anaplasia.

A linhagem apresenta células aderentes e células em suspensão. As células em suspensão possuem uma mistura de células em diferentes fases de maturidade e células em processo de morte. O tempo de duplicação dessa linhagem, cultivada em meio 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), varia de 40 a 80 horas.

As células RPMI 8226 foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10 % de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina, 24 mM NaHCO₃. Estas células foram mantidas em incubadora úmida de CO₂ (5%) a 37°C até confluência (Freshney, 1994). A linhagem de células foi adquirida do American Tissue Culture Collection (ATCC) em 2007.

3.2 Reagentes

O meio de cultura RPMI 1640 e o soro fetal bovino são provenientes da CultiLab. O VEGF e bFGF foram quantificados pelo do kit de ELISA da RayBio® e a IL-6 e o TGFβ pelo kit de ELISA da eBioscience®.

3.3 Metodologias

3.3.1 Cultivo celular

As células RPMI 8226 foram descongeladas gradualmente à temperatura ambiente, dentro do fluxo laminar previamente preparado. Após descongelamento foram imediatamente transferidas para um tubo estéril contendo 5 mL de meio RPMI. O tubo foi fechado e centrifugado a 2000 rpm durante 5 minutos. No fluxo laminar, o tubo foi aberto e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 3 mL de meio RPMI para ressuspender o pellet de células. As células foram transferidas para um frasco de cultivo celular de 75 cm², previamente esterilizado no microondas, em potência máxima durante 20 minutos. Acrescentou-se à garrafa 10 mL de meio RPMI, 2 mL de soro fetal bovino e 150 µL de solução penicilina/amicacina. A garrafa foi fechada e levada para incubação à temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂.

A expansão de células em cultura foi monitorada pela visualização das células no microscópio invertido. As células foram mantidas a 37°C em incubadora de atmosfera úmida com 5% de CO₂ até confluência para realização do subcultivo celular. A expansão das células foi realizada entre 48 a 62 horas para manter a

viabilidade de células fornecendo novo meio nutriente. O conteúdo do frasco de cultivo foi transferido para um tubo estéril e foi centrifugado por 3 a 5 minutos a 2000 rpm. No fluxo laminar o sobrenadante foi desprezado e o pellet de células ressuspenso em 3 mL de meio RPMI. As células foram distribuídas em dois frascos de cultivo e suplementadas com meio de cultura, soro fetal bovino e penicilina/amicacina.

3.3.2 Viabilidade celular

As células foram plaqueadas na densidade de 1×10^6 células RPMI 8226 em cada poço em um volume de um mL, mantidas sob condições de cultura, em placas de 96 poços, em triplicata, nos diferentes tratamentos, ou seja, concentrações de 0,3 μ Mol, 0,6 μ Mol e 0,9 μ Mol de pravastatina. As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas consecutivas. Diariamente realizou-se a quantificação de células viáveis pelo método do azul de trypan.

- 1) A suspensão de células foi preparada em solução de sais balanceada.
- 2) Transferiu-se 0,5 mL da solução 0,4% de Azul de Trypan (w/v) para um tubo de 1,5 mL. Adicionou-se 0,3 ml de HBSS (PBS ou salina) e 0,2 ml da suspensão celular (fator de diluição = 5) e homogeneizou-se completamente. A suspensão foi deixada em repouso por 5 a 15 minutos.
- 3) A suspensão foi inserida na câmara de Neubauer. Foram realizadas duas contagens: um contagem para células viáveis e outra para células não viáveis. As células não viáveis coram-se de azul, devido a entrada do corante no interior da célula.

CÉLULAS POR mL = total de contadas X fator de diluição X 10^4

VIABILIDADE CELULAR (%) = total de células viáveis (não coradas) / total de células (coradas e não coradas) X 100. (Sigma pp. 1885).

3.3.3 Avaliação do ciclo celular

A análise do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o iodeto de propídio (IP), que é um fluorocromo que se intercala estequiometricamente a cada quatro pares de bases do DNA. Cerca de 2×10^6 células (RPMI 8226) foram mantidas em cultura, tripsinizadas com uma solução de 0.05% tripsina e 0.02% EDTA, lavadas 2 vezes em PBS, permeabilizadas em 70% etanol, e coradas com iodeto de propídio por 30 min protegido da luz. O processo foi executado após 24, 48 e 72 horas da adição de pravastatina aos cultivos celulares. As células provenientes foram submetidas à citometria de fluxo no equipamento FACScalibur, Beckton Dickson no Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). A fluorescência vermelha de IP emitida foi mensurada em escala linear de 256 canais, no filtro de 585/42 nm. Avaliou-se o aparecimento de células hipodiplóides (identificadas como populações de células que contém quantidade de DNA inferior à quantidade observada nas fases G0/G1). As análises foram realizadas utilizando o software ModFitLT v. 2.0 (PMac) e WinMDI 2.8 (PC), <http://facs.scripps.edu/software.html>.

O procedimento está descrito no apêndice um (1).

3.3.4 Avaliação dos fatores de crescimento

Os fatores de crescimento investigados foram a IL6, VEGF, bFGF e TGF β , após o tratamento das células em cultura com pravastatina em três diferentes concentrações: 0,3 μ M - 0,6 μ M – 0,9 μ M. As amostras de sobrenadante foram retiradas após 24 – 48 e 72 horas após a adição da pravastatina. O sobrenadante foi submetido a análise através do método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para determinação dos níveis dos fatores de crescimento pesquisados. O método de ELISA utilizado foi o método do sanduíche e a leitura foi realizada na leitora Lab Life MX PN 2001 na faixa de 450/690 nm. O VEGF e bFGF foram quantificados pelo kit RayBio® e a IL-6 e o TGF β pelo kit eBioscience® seguindo a metodologia descrita no protocolo do kit.

Os respectivos procedimentos, para cada um dos fatores avaliados encontra-se descrito nos apêndices dois, três e quatro.

4 Resultados

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes aos artigos científicos:

Capítulo I

QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS FATORES DE CRESCIMENTO IL-6, TGF-B, VEGF E B-FGF NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE MIELOMA MULTIPLO. UMA CORRELAÇÃO COM O MICROAMBIENTE TUMORAL.

Capítulo II

CO-RELAÇÃO ENTRE METABOLISMO LIPÍDICO, CICLO CELULAR E SECREÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO EM MIELOMA MÚLTIPLO.

Capítulo I

QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS FATORES DE CRESCIMENTO IL-6, TGF-B, VEGF E B-FGF NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE MIELOMA MULTIPLO. UMA CORRELAÇÃO COM O MICROAMBIENTE TUMORAL.

Paula Josiane Janowski Trojan¹, Milton Sérgio Bohatch Jr¹, Paula Daiane Matkovski¹, Giovani Marino Favero¹

¹ Universidade Estadual de Ponta Grossa, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas Básica e Aplicada a Biologia e Saúde. Av. Carlos Cavalcanti 4748, Bairro Uvaranas, Ponta Grossa – PR, Brasil.

CEP 84030-900

Telefone: (42)- 3220-3128; Fax (42) -3220-3102

gmfavero@uepg.br

Recebido para publicação na revista Publicatio em 11/03/2010

Aceito para publicação na revista Publicatio em 04/05/2010

Resumo

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia de plasmócitos, caracterizado pela proliferação excessiva de células tumorais malignas na medula óssea. No Mieloma, a medula óssea atua como o microambiente ideal para a sobrevivência e proliferação dos plasmócitos modificados. Dentro desse microambiente, há uma complexa rede de sinalização celular envolvendo várias citocinas, conferindo sobrevivência, favorecendo o desenvolvimento do tumor e a resistência aos quimioterápicos. O propósito desse trabalho experimental foi investigar a secreção de citocinas (IL-6, TGF- β , VEGF e B-FGF) em uma linhagem celular de MM (RPMI 8226). As células do MM foram cultivadas em frascos de cultura contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e mantidas em incubadora de tensão de CO₂ a 5% e 37°C. A quantificação de citocinas e fatores de crescimento presentes no sobrenadante da cultura celular de mieloma múltiplo foi realizada através do método de ELISA. As citocinas mensuradas no sobrenadante celular, em especial a IL-6 e o VEGF, relacionam-se diretamente com o microambiente tumoral, promovendo a angiogênese e ativando vias de sinalização anti-apoptóticas, o que confere às células de MM características de sobrevivência e proliferação.

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a monoclonal neoplasia of plasma cells, characterized by excessive proliferation of malignant plasma cells in bone marrow. The bone marrow microenvironment is necessary for survival and proliferation of MM cells. Within this microenvironment, there is a complex cellular signaling involving multiple cytokines, conferring survival, tumor development and resistance to chemotherapeutic agents. The purpose of this experimental work was to investigate the secretion of cytokines (IL-6, TGF- β , VEGF and FGF- β) in a MM cell line (RPMI 8226). MM cells were cultured in culture flasks containing RPMI 1640 supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and kept in an incubator CO₂ tension to 5% and 37^o C. Quantification of cytokines and growth factors present in the cell culture supernatant of multiple myeloma was performed using the ELISA method. Cytokines measured in cell supernatants, especially IL-6 and VEGF, relate directly to the tumor microenvironment, promoting angiogenesis and signaling pathways activating anti-apoptotic, giving the characteristics of MM cell survival and proliferation.

Introdução

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia monoclonal dos plasmócitos, caracterizado pela proliferação excessiva dos mesmos na medula óssea (Hideshima et al, 2004). A medula óssea é o microambiente necessário para a sobrevivência e proliferação das células de MM. Dentro desse microambiente, há uma complexa rede de sinalização celular entre as células do MM e as células do estroma medular (CEM), envolvendo citocinas, receptores e moléculas de adesão. Essas interações conferem sobrevivência, desenvolvimento do tumor e resistência aos quimioterápicos (Bommert et al, 2006; Kuehl et al, 2002).

Vários estudos demonstraram o papel chave da interleucina-6 (IL-6) como o principal fator de crescimento e de sobrevivência para as células do MM (Anderson et al, 1989; Klein et al, 1989; Kawano et al, 1988). Em circunstâncias normais, a IL-6 causa a diferenciação dos plasmócitos, enquanto que na patogênese do MM, ela causa proliferação e também inibe a apoptose das células cancerígenas (Klein et al, 1995; Chauhan et al, 1996). Há uma série de eventos dentro do microambiente tumoral que levam a secreção de IL-6. Algumas células de MM secretam IL-6 como fator de crescimento. Entretanto, são as CEM as maiores responsáveis pela secreção de IL-6 no microambiente tumoral. Tais células aumentam a secreção desta citocina em resposta à aderência das células de MM sobre as mesmas (Chauhan et al 1996; Uchiyama et al 1993). Há também um looping parácrino, no qual as células de MM secretam VEGF que estimula as CEM a secretarem mais IL-6 no microambiente (Uchiyama et al, 1993; Dankbar et al, 2000).

Estudos demonstraram o envolvimento da angiogênese na patogênese de várias neoplasias hematológicas (Ribatti et al, 1996; Fiedler et al, 1997; Aguayo et al, 2000), de modo que o aumento da densidade capilar está relacionado com pior prognóstico (Sezer et al, 2000; Rajkumar et al, 2000). Foi também reportado que pacientes com MM apresentam altos níveis de citocinas angiogênicas (VEGF, bFGF e HGF) na medula óssea (Raimondo et al 2000). A maioria das linhagens de MM secretam VEGF, enquanto que as CEMs secretam tanto VEGF quanto bFGF, resultando em uma imbricada relação que aumenta a adesão das células de MM, além de promover angiogênese no microambiente tumoral (Ribatti et al, 1996).

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) está presente durante toda a vida do tumor, sendo ele essencial e fator primário no desenvolvimento do mesmo. À medida que a massa tumoral multiplica-se são ativados fatores secundários relacionados com a angiogênese, como as citocinas e outros fatores de crescimento: fator de crescimento fibroblástico beta (β FGF) e fator transformador de crescimento beta (TGF β). Porém, o VEGF continua sendo o principal fator pró-angiogênico nos tumores (Pereira et al 2008).

Este trabalho tem como objeto de estudo mensurar a quantidade de quatro importantes citocinas envolvidas na patogênese do MM (VEGF, bFGF, TGF-B e IL-6). Estas citocinas estão presentes no sobrenadante da linhagem celular de MM - RPMI 8226.

Material e Métodos

Cultivo Celular

A linhagem RPMI 8226 é uma linhagem de MM humana, oriunda de sangue periférico e foi estabelecida em 16/06/1966 por Moore e Kitamura no Roswell Park Memorial Institute (Moore et al, 1968). Trata-se da linhagem de MM mais bem documentada e com considerável estabilidade genética. Tem características fenotípicas de células linfoplasmocitárias, com alto grau de anaplasia e apresenta um tempo de dobramento de 40-80 horas. Diferente de outras linhagens de MM, esta linhagem ocorreu espontaneamente sem a infecção in vitro pelo vírus do Epstein-Barr (Klein et al,1987; Minowada et al,1974). As células de MM (RPMI 8226) foram doadas pelo Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski da Faculdade de Medicina da USP.

As células foram cultivadas em frascos próprios de cultura, utilizando meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e mantidas em incubadora a 37°C de atmosfera úmida com 5% de CO₂ até confluência (Freshney RI, 1994). O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer (-4 °C).

Quantificação das Citocinas

A quantificação das citocinas e dos fatores de crescimento presentes no sobrenadante de MM foi realizada através do método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), por leitora ELISA (Lab Life MX PN 2001) na faixa de

450/690 nm. O VEGF e o β -FGF foram quantificados utilizando-se kit RayBio[®], enquanto a IL-6 e o TGF- β foram quantificados utilizando-se kit eBioscience[®], segundo a metodologia descrita pelos fabricantes.

RESULTADOS

Quantificação dos fatores de crescimento e citocinas

De acordo com a metodologia descrita pelo fabricante, realizou-se a média dos valores obtidos nas quatro medições, de cada fator e citocina de crescimento presentes no sobrenadante de mieloma múltiplo, obtendo-se o valor da absorbância. Foram realizados os cálculos dos valores das concentrações em pg/mL (**Tabela 1**). Com o resultado da média dos valores, pode-se verificar a presença de quantidades significativas de fatores de crescimento e citocinas.

Tabela 1. Quantificação das citocinas presentes no sobrenadante de cultura de mieloma múltiplo imortalizada.

Fatores de Crescimento	Média (pg/mL)	Desvio Padrão
VEGF	247,3	± 3,296
IL-6	8033,3	± 8,963
TFG- β	19,8118	± 5,80917
FGF	9,8333	± 0,3512

Discussão

Vários fatores e citocinas compõem o microambiente da medula-óssea, sendo essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência do MM. Busca-se uma maior compreensão dos fatores desse microambiente para eleger novos alvos que possam ser utilizados em terapias mais eficazes. Os fatores de crescimento e a citocina mensurados no presente artigo, estão estreitamente envolvidos na sinalização celular que estimula o crescimento e inibe a apoptose das células neoplásicas, bem como promove a angiogênese.

A citocina presente no sobrenadante (interleucina-6) liga-se a proteínas transmembrana (gp130) presentes na superfície de algumas células, desencadeando a ativação da via PI3K/mTOR/p70S6K que resulta na angiogênese, além de ter ação direta sobre os inibidores das proteínas reguladoras do ciclo celular, inibindo os sinais pró-apoptóticos. A IL-6 também age induzindo sinais anti-apoptose, através da transcrição aumentada do gene Bcl2 (função anti-apoptótica) e inibidores de caspase (Ishikawa et al, 2006). Essa sinalização também promove a secreção autócrina de VEGF pelos plasmócitos, que regula a produção de citocinas e a expressão das moléculas de adesão (Uchiyama et al, 1992).

As células do estroma da medula óssea fornecem apoio eficaz para a sobrevivência e proliferação das células do mieloma múltiplo, produzindo um elevado nível de interleucina IL-6 (Anderson et al, 1989). Através da interação com CEM, as células do mieloma também produzem de citocinas que estimulam a osteoclastogênese e a angiogênese (Klein et al, 1989).

O aumento da densidade microvascular na medula óssea em consequência da angiogênese é induzido pelo VEGF secretado pelas células do mieloma e do estroma medular. Essa produção de VEGF decorre do estímulo direto da IL-6 produzida pelas células do microambiente, o que proporciona a sobrevivência dos plasmócitos neoplásicos (Uchiyama et al, 1992). Aliado a isso, as células tumorais têm desenvolvido uma variedade de mecanismos para evitar a resposta imune. Um destes mecanismos envolve a inibição de células dendríticas (células apresentadoras de antígenos) que estimulam as células B e células T. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) pode impedir a maturação funcional das células dendríticas a partir de seus progenitores hematopoiéticos. Dessa maneira, a secreção de VEGF pelo tumor pode desempenhar um importante papel na supressão da resposta imunológica antitumoral. Outro mecanismo inclui o TGF β , que elimina as células B e T através da inibição da via de sinalização autócrina de interleucina-2 (IL-2) (Urashima et al, 1996).

A elucidação dos fatores de crescimento que integram o microambiente tumoral pode gerar promissores alvos terapêuticos para intervenções mais efetivas na remissão do processo neoplásico, através da inibição direta ou indireta desses fatores e citocinas. O presente artigo demonstrou que várias citocinas importantes na patogênese são secretadas pelas próprias células do MM, levando a uma retro-alimentação positiva para a expansão tumoral e para a angiogênese, e possivelmente, a uma maior tolerância a apoptose. Justifica-se, dessa forma, o comportamento agressivo, as características de resistência à quimioterapia e o alto potencial de letalidade relacionado ao MM.

Auxílio Financeiro: Fundação Araucária e CNPq.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas em conjunto no final da dissertação com as demais referências utilizadas.

Capítulo II

CO-RELAÇÃO ENTRE METABOLISMO LIPÍDICO, CICLO CELULAR E SECREÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO EM MIELOMA MÚLTIPLO

Paula Josiane Janowski Trojan¹, Milton Sérgio Bohatch Jr¹, Giovani Marino Favero¹

¹ Universidade Estadual de Ponta Grossa, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas Básica e Aplicada a Biologia e Saúde.

Resumo

O mieloma múltiplo é uma neoplasia de células B que se inicia na medula óssea e caracteriza-se pela elevada produção de anticorpos monoclonais, denominados proteína M. O microambiente da medula óssea favorece a progressão da doença através da secreção de fatores de crescimento que impulsionam o crescimento tumoral, facilitam a sobrevivência celular e favorecem a migração e invasão tumoral em outros tecidos. Dentre estes fatores destacam-se a IL6, VEGF, bFGF e TGF β . A IL6 é fator chave para desenvolvimento do MM, ativando vias de sinalização importantes para proliferação e sobrevivência celular; VEGF e bFGF estão implicados principalmente com processo de neo-vascularização do tumor e o TGF β relaciona-se a diferenciação de osteoblastos, imunomodulação e interferência no ciclo celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da pravastatina, droga empregada na redução do colesterol, em uma linhagem de células de MM (RPMI 8226) em cultura. Observou-se a redução da viabilidade celular, o aumento de células na fase G0/G1 do ciclo celular e a redução dos fatores VEGF e FGF. Estes resultados abrem novas perspectivas e demonstram o potencial terapêutico da pravastatina. Novas investigações devem ser conduzidas delimitando as doses necessárias bem como possíveis efeitos colaterais.

Introdução

O MM (mieloma múltiplo) é uma doença neoplásica que afeta as células B completamente diferenciadas, secretoras de anticorpos, que surge e se expande na medula óssea (Zhan et al, 2006; Giuliani e Rizzoli, 2007). É a segunda neoplasia hematopoiética mais frequente, responsável por cerca de 10% das neoplasias hematopoiéticas e 1% de todos os cânceres humanos (Gadó et al, 2001). A proliferação das células tumorais na medula óssea ocasiona a destruição óssea, suprime a produção de anticorpos e leva à insuficiência renal (Ludwig et al, 2010; Raab et al, 2009). O microambiente da medula óssea é constituído pela matriz extracelular e diferentes tipos celulares capazes de secretar diversos fatores de crescimento (Giuliani e Rizzoli, 2007; Balakumaran et al, 2011). A adesão das células de MM à medula óssea aumenta a secreção de citocinas que por sua vez, estimulam a proliferação de células tumorais, contribuem para sua sobrevivência e migração e induzem a resistência aos quimioterápicos (Peng et al, 2011).

A inflamação crônica contribui para a progressão do câncer, mas os mecanismos subjacentes a esta correlação ainda permanecem obscuros (Roland et al, 2009). Citocinas podem promover ou inibir a proliferação e desenvolvimento do tumor (Grivennikov et al, 2010; Coussens e Werb, 2002). Moléculas inflamatórias relacionadas aos processos tumorais e moléculas de adesão apresentam um ponto em comum: são reguladas pelo fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear κ B) (Aggarwal e Gehlot, 2009). A IL-6 (interleucina 6) apresenta efeitos pleiotrópicos, participando da resposta imune, hematopoiese, diferenciação celular, reparo de feridas e remodelação óssea (Tawara et al, 2011). A secreção de IL6 no MM tem

origem parácrina e autócrina (Xiang et al, 2011). A evolução do MM encontra-se condicionada a mecanismos angiogênicos e vários estudos buscam a relação entre fatores angiogênicos, como FGF (fator de crescimento dos fibroblastos) e VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), o prognóstico da doença e a sensibilidade à terapia (Greco et al, 2009). Demonstrou-se que os níveis de VEGF e FGF estão elevados em pacientes com MM e, com frequência, correlacionados entre si e com outros fatores angiogênicos (Greco et al, 2009). A ligação de TGF β (fator de crescimento e transformação β) ao seu receptor promove ativação de mediadores intracelulares, cujos efeitos incluem a imunomodulação, ciclo celular e angiogênese (Ma e Ma, 2011).

As estatinas são drogas que inibem a enzima HMG-CoA reductase (hidroximetilglutaril coenzima a reductase), essencial na biossíntese do colesterol (Medina, 2010; Musso et al, 2011). O produto da reação catalisada pela enzima HMG-CoA reductase, o ácido L- mevalônico é precursor de moléculas como colesterol, isopenteniladenina, dolicol, ubiquinona, geranylpirofosfato (GGPP) farnesilpirofosfato (FPP) (Wong et al, 2007; Gauthaman et al, 2009). A redução na síntese de isoprenóides (GGPP, FPP), diminui sua ligação com proteínas celulares responsáveis pela sinalização intracelular como Rho, Rac e Cdc42 (membros da família das GTPases) (Roy et al, 2011; Musso et al, 2011).

O objetivo deste estudo consistiu na avaliação dos efeitos da pravastatina sobre células de MM em cultura, linhagem RPMI 8226. Investigou-se a proliferação celular, o ciclo celular e as alterações ocorridas nos níveis dos fatores de crescimento IL-6, VEGF, FGF e TGF β após tratamento com pravastatina. Os

efeitos resultantes mostraram redução da viabilidade celular, aumento de células na fase G0/G1 e redução dos fatores VEGF e FGF.

Material e métodos

A linhagem RPMI 8226 é constituída por células de mieloma múltiplo, oriunda de sangue periférico que foi estabelecida em 1966 por Moore e Kitamura no Roswell Park Memorial Institute (Moore et al, 1968). Esta linhagem ocorreu espontaneamente sem infecção in vitro pelo vírus de Epstein Baar. A linhagem é bem documentada com considerável estabilidade genética. Apresenta características fenotípicas de células linfoplasmocitárias, com alto grau de anaplasia.

Cultivo celular

A linhagem de células de MM RPMI 8226 foi cultivada em meio RPMI adicionado de 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg de estreptomicina e incubada em atmosfera de 5% de CO₂ em temperatura de 37 °C. O crescimento celular foi monitorado através da visualização das células em cultura no microscópio invertido. Após a confluência das células as mesmas eram submetidas à expansão pela troca do meio e a divisão das células em novas garrafas de cultivo. O procedimento foi realizado até obtenção do número necessário de células, dependendo do procedimento a ser realizado.

Viabilidade celular

Células da linhagem RPMI 8226 foram plaqueadas na densidade de 1×10^6 células/por poço. Um total de 96 poços foram utilizados, sendo que a estes adicionou-se três concentrações diferentes de pravastatina ($0,3 \mu\text{M}$ - $0,6 \mu\text{M}$ e $0,9 \mu\text{M}$), em triplicada. As células foram incubadas por 72 horas em atmosfera de 5% de CO_2 e $37 \text{ }^\circ\text{C}$. A quantificação das células foi realizada nos tempos de 24, 48 e 72 horas através da técnica do azul de trypan. As contagens celulares foram realizadas na Câmara de Neubauer e então calculadas:

Células por mL = total de células contadas x fator de diluição $\times 10^4$

Viabilidade celular (%) = células viáveis/ número total de células $\times 100$

Avaliação do ciclo celular

A análise do ciclo celular foi efetuada por citometria de fluxo no aparelho Facs Excalibur, utilizando iodeto de propídio. Aproximadamente 2×10^6 células foram mantidas em cultura, sendo que uma das culturas, sem pravastatina, correspondeu ao controle. Outras amostras foram tratadas com $0,3 \mu\text{M}$, $0,6 \mu\text{M}$ e $0,9 \mu\text{M}$ de pravastatina. Foram separadas amostras 24, 48 e 72 horas após a adição da pravastatina. Após este período as células foram permeabilizadas em álcool 70% e coradas com iodeto de propídio. A citometria de fluxo foi realizada em escala linear de 256 canais no filtro 585/42. Observou-se as células hipodiplóides. As análises utilizaram o software ModFitLT v. 2.0 (Pmac) e WinMDI 2.8 (PC).

Avaliação dos fatores de crescimento

Os fatores de crescimento investigados foram a IL6, VEGF, bFGF e TGF β , após o tratamento das células em cultura com pravastatina em três diferentes concentrações: 0,3 μ M - 0,6 μ M – 0,9 μ M. As amostras de sobrenadante foram retiradas após 24, 48 e 72 horas do contato das células com a pravastatina. O sobrenadante foi submetido a análise através do método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para determinação dos níveis dos fatores de crescimento pesquisados. O método de ELISA utilizado foi o método do sanduíche e a leitura foi realizada na leitora Lab Life MX PN 2001.na faixa de 450/690 nm. O VEGF e bFGF foram quantificados pelo kit RayBio® e a IL-6 e o TGF β pelo kit eBioscience® seguindo a metodologia descrita pelos fabricantes.

Análise Estatística:

Graph Pad Prism Stat 3,0; Método Anova com pós teste de Bonferron; p < 0,05.

RESULTADOS

Na avaliação da viabilidade celular ocorreu a diminuição do número de células após a adição da pravastatina, sendo que esta redução foi significativa em concentrações mais elevadas de pravastatina (0,6 μ M e 0,9 μ M) (figura 1). Pravastatina a 0,3 μ M não foi capaz de promover efeitos significativos no número de células. As concentrações 0,6 μ M e 0,9 μ M promoveram efeito citostático após 72 horas de incubação, mostrando que este efeito depende, além da dose empregada, do tempo que a pravastatina permanece em contato com as células tumorais.

Avaliação da proliferação celular

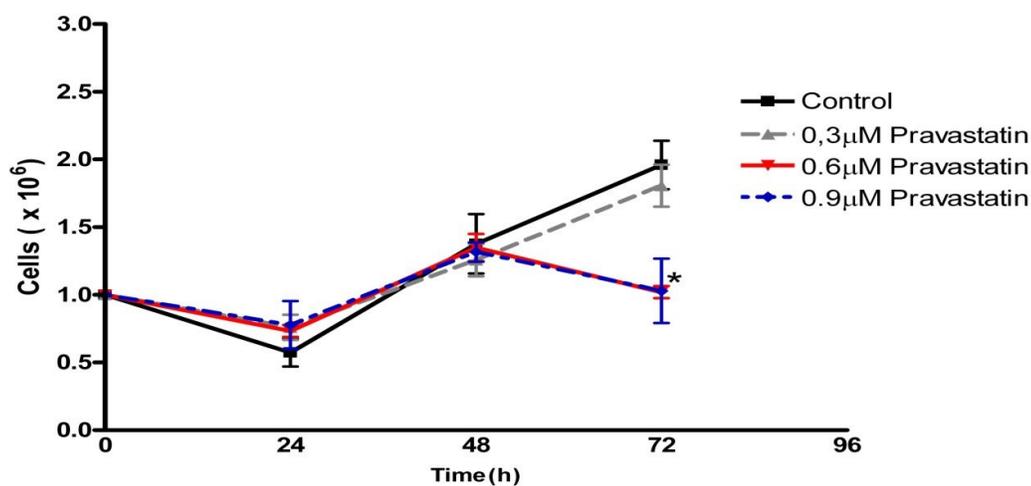


Figura 1: redução da proliferação de células RPMI 8226 incubadas com diferentes concentrações de pravastatina e avaliadas após 24, 48 e 72 horas.

O tratamento das células de MM em cultura com pravastatina nas concentrações 0,3 μM , 0,6 μM e 0,9 μM , após 72 horas do tratamento, promove o aumento do número de células na fase G0/G1 (figura 2.1). A concentração de 0,3 μM de pravastatina foi insuficiente para proporcionar a parada do ciclo celular em quantidade significativa de células tumorais. O aprisionamento das células na fase G0/G1 depende da concentração da pravastatina empregada e do tempo em que a mesma permanece em contato com as células de MM.

Avaliação do ciclo celular

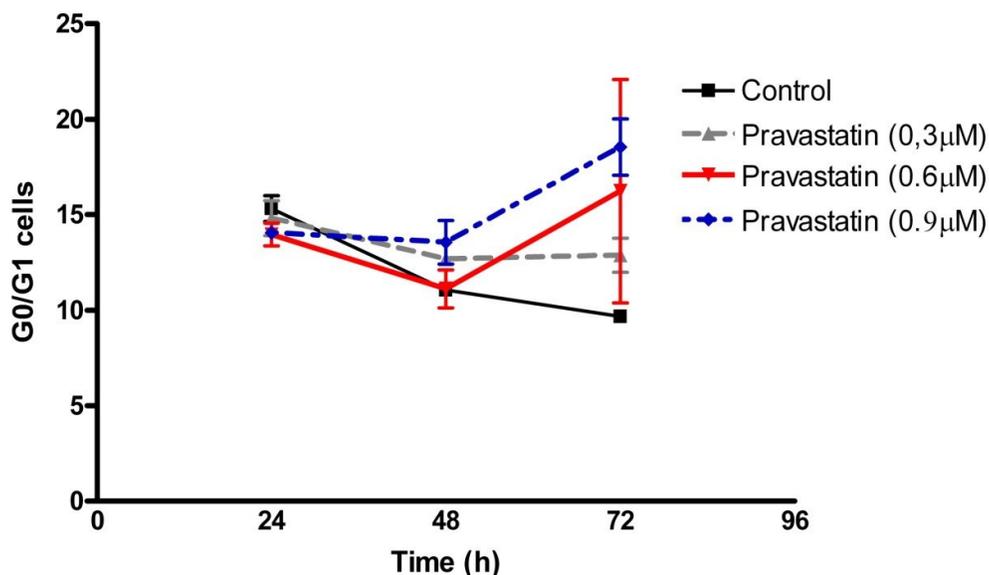


Figura 2.1: Aumento de células na fase G0/G1 do ciclo celular induzido por diferentes concentrações de pravastatina após 24, 48 e 72 horas de tratamento, sendo $p < 0,05$.

O histograma mostra um maior número de células na fase G0/G1 à medida que ocorre o aumento da concentração de pravastatina e que o intervalo de tempo é maior (72 horas) (figura 2.2).

Histograma do ciclo celular

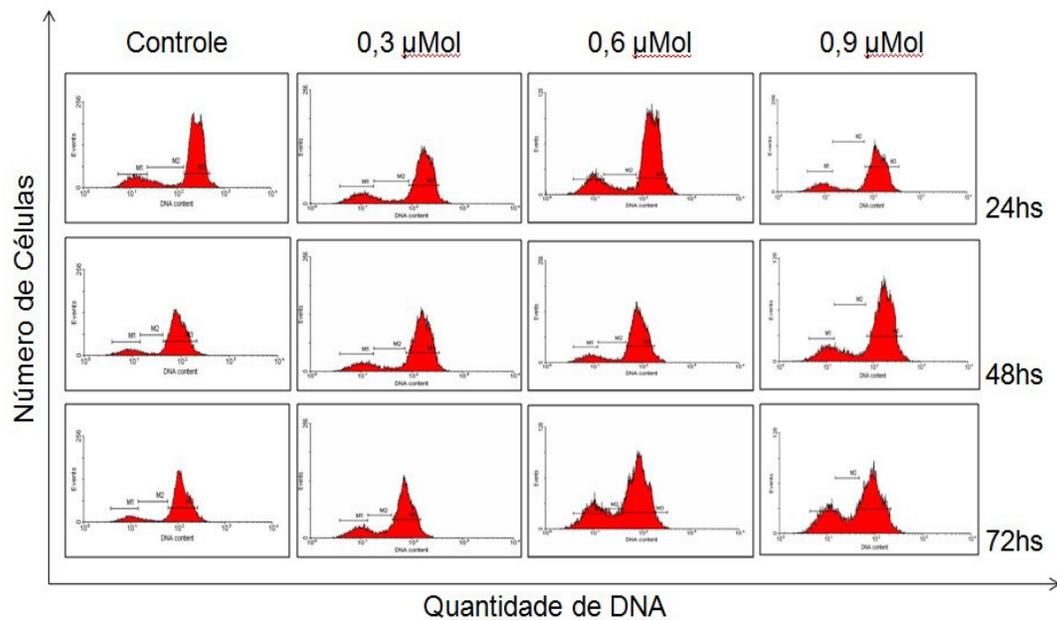


Figura 2.2: Histograma mostrando os efeitos de pravastatina ao longo do ciclo celular, após 24, 48 e 72 horas.

Os níveis dos fatores Il-6, VEGF, FGF e TGF β presentes no sobrenadante da cultura celular foram avaliados através do método de ELISA. Os níveis de VEGF mostraram redução estatisticamente relevante após 24, 48 e 72 horas de contato com a pravastatina, sendo que a diminuição mais acentuada ocorreu com 0,3 μ M de pravastatina e, com 0,6 μ M e 0,9 μ M este efeito foi progressivamente menor.

Avaliação dos níveis de VEGF no sobrenadante do cultivo celular

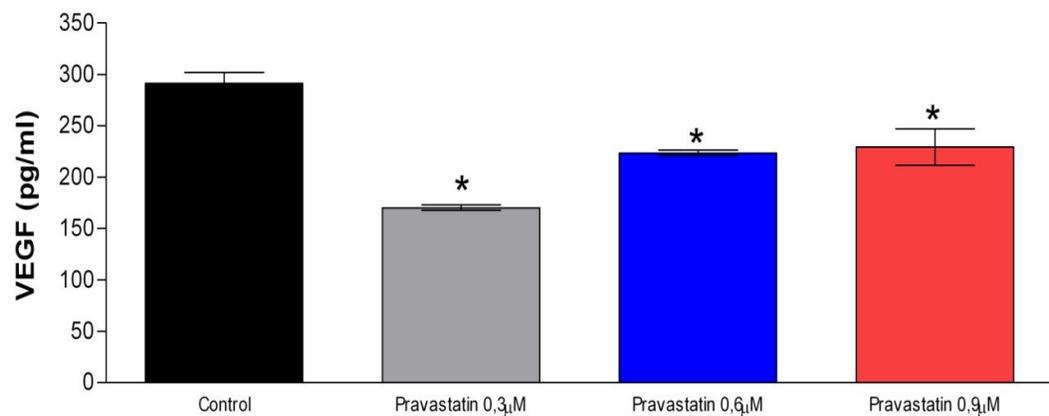


Figura 3: Efeito da pravastatina sobre os níveis do fator VEGF, com três diferentes concentrações de pravastatina.

A pravastatina promoveu a redução acentuada de FGF quando empregou-se a solução de 0,9 μM de pravastatina. Neste caso, concentrações inferiores (0,3 μM e 0,6 μM), não ocasionaram efeito relevante nos níveis de FGF, quando comparados ao controle.

Avaliação dos níveis de FGF no sobrenadante do cultivo celular

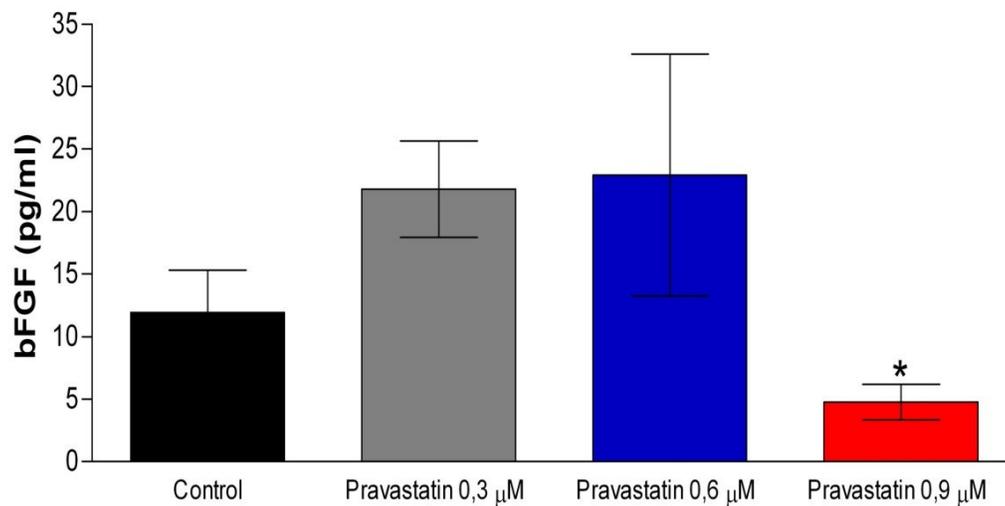


Figura 4: Efeito da pravastatina sobre os níveis do fator bFGF, com três diferentes concentrações de pravastatina.

A determinação dos níveis de IL-6 no sobrenadante não evidenciou efeitos marcantes quando comparados aos níveis de IL-6 no controle. Houve a diminuição de IL-6 nas três concentrações empregadas, porém esta redução não foi estatisticamente relevante. O mesmo resultado foi observado com a avaliação do fator TGF β , onde não se obteve alterações estatisticamente relevantes.

Avaliação dos níveis de IL-6 no sobrenadante do cultivo celular

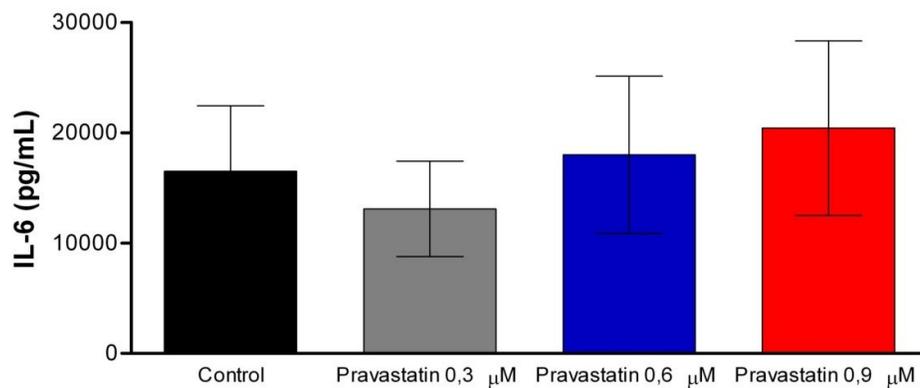


Figura 5: Efeito da pravastatina sobre os níveis do fator FGF, com três diferentes concentrações de pravastatina.

Discussão

O aumento do conhecimento dos mecanismos intra e extracelulares, associados a interações celulares mudaram a perspectiva no tratamento do MM. Atualmente, a melhor perspectiva de remissão total da doença é o transplante de medula óssea. Este trabalho está baseado em características bioquímicas diferenciadas neste tipo de neoplasia, assim avaliou-se o efeito de um inibidor da enzima chave no metabolismo intracelular do colesterol, a pravastatina, uma estatina hidrofílica, em uma linhagem células de Mieloma Múltiplo amplamente estudada.

A literatura específica apresenta diferentes atividades de estatinas em células neoplásicas, como indução a apoptose, diminuição da proliferação celular, aprisionamento de células na fase G0/G1 do ciclo celular e redução de citocinas inflamatórias, testados em várias neoplasias como: melanoma (Favero et al, 2010), câncer de tireóide (Zhong et al, 2011), osteossarcoma (Tsubakia et al, 2011), carcinoma hepatocelular (Tijeras-Raballan, 2010).

Vários estudos mostraram que estatinas reduzem a proliferação celular em neoplasias hematopoiéticas como leucemia linfóide crônica (Podhoreka et al, 2010), leucemia promielocítica aguda NB4 (Sassano et al, 2007) e mieloma múltiplo (Otsuki et al, 2004).

O estudo conduzido por Otsuki et al (2004) mostraram os efeitos antiproliferativos da sinvastatina sobre as células de MM em cultura, mas com diferentes linhagens celulares de MM. Wong et al (2007) evidenciaram que a sensibilidade das células a lovastatina está associada com um perfil específico de

anormalidades genéticas. Clendening et al (2010), atribuíram a sensibilidade das células neoplásicas às estatinas a desregulação da via do mevalonato. O risco de desenvolver câncer de cólon poderia estar relacionado a expressão da enzima HMG-CoA reductase sem o éxon 13 o que limitaria a ligação da estatina com a enzima (Millerb et al, 2011). Após a avaliação de um grande painel de células de MM Wong et al (2007) constatou que cerca de 50% das linhagens estudadas são sensíveis a lovastatina.

Os efeitos também se relacionam diretamente a dose de estatina empregada. A concentração de estatinas influencia o número de células viáveis em outras neoplasias como Glynn et al (2008) demonstrou em células de melanoma e Sassano et al (2007) em células de leucemia promielocítica.

Os efeitos das estatinas sobre a proliferação celular também foram avaliados in vivo, em neoplasias como melanoma (Favero et al, 2010), câncer de cólon (Cho et al, 2008), carcinoma hepatocelular (Tijeras Raballand et al, 2010), sendo que em todos os estudos citados ocorreu redução do tamanho do tumor após tratamento com estatinas.

No estudo conduzido por Otsuki et al (2003) cerca de um terço das linhagens de MM testadas mostraram-se sensíveis a pravastatina, porém não ocorreu acúmulo de células tumorais na fase G0/G1. Linhagens diferentes de melanoma mostraram suscetibilidade variada às estatinas, quanto aos efeitos relacionados à parada do ciclo celular e apoptose (Minichsdorfer; Hohenegger, 2009).

Este efeito foi observado em outras neoplasias como no estudo de Zhong et al (2011) onde a lovastatina inibiu a proliferação de células ATC, de linhagens

câncer de tireóide agressivo, *in vitro*, elevando o nível da proteína p27, que inibe a atividade de CDK2 prendendo as células na fase G1.

Outros efeitos atribuídos às estatinas referem-se aos mediadores inflamatórios. Neste estudo avaliou-se o efeito da pravastatina em quatro fatores de crescimento, onde se observou a redução de VEGF e bFGF quando foram comparadas células tratadas com pravastatina e células controle. Não houve alterações nas concentrações de TGF β e de IL-6.

A IL-6, relevante fator na progressão do mieloma múltiplo, não sofreu redução significativa após o tratamento com pravastatina, resultado semelhante foi obtido por Otsuki et al (2003), em linhagens diferentes de MM tratadas com pravastatina. A IL-6 é secretada de forma autócrina, pelas células de MM, e parácrina, secreção pelas células do estroma da medula óssea, células imunes e osteoclastos (Xiang et al, 2011). Nos dois estudos citados avaliou-se somente a secreção de IL-6 pelas células tumorais do MM.

A redução dos mediadores VEGF e FGF foi observada por outros autores após tratamento de células neoplásicas com estatinas, como no estudo de Cho et al (2011) onde ocorreu a redução de VEGF, *in vivo* e *in vitro*, após o tratamento de células de câncer colorretal com sinvastatina. Tsubakia et al (2011) verificaram que as estatinas reduzem RNAm para os fatores FGF, HGF e TGF β em células de osteossarcoma em cultura. A redução destes fatores de crescimento se deve a inibição da formação de GGPP (geranyl-geranyl pirofosfato) impedindo a localização de Ras na membrana plasmática e a consequente ativação das vias MEK/ERK

(sinal extracelular controlado pela quinase) e PI3K/AKT (fosfatidilinositol quinase 3/proteína quinase C).

Wanga et al (2011) mostraram que a atorvastatina reduziu a expressão de RNAm das citocinas IL-1 (4,6 vezes), IL-6 (1,5 vezes) e IL-8 (3,6) em linfócitos normais do sangue periférico in vitro. Também ocorreu diminuição de TGF β -1, em cerca de 1,3 vezes, e de TGF β -2 em 2,8 vezes. Neste estudo utilizaram-se células neoplásicas e talvez este tenha sido o diferencial uma vez que Wanga et al (2011) empregaram células normais.

As estatinas também mostraram efeitos positivos quando associadas a outras drogas anti-câncer, o que permitiria a redução da dose de estatinas empregada, evitando assim efeitos adversos relacionados a altas doses de estatinas. Hus et al (2011) realizaram um estudo comparativo com pacientes de MM em recidiva ou refratários ao tratamento, utilizando dois esquemas terapêuticos; o grupo TD recebeu talidomida e dexametasona e o grupo TDL talidomida, dexametazona e lovastatina. Ocorreu 50% de redução na banda monoclonal em 32% dos pacientes do grupo TD e 44% dos pacientes do grupo TDL. Estes resultados sugerem que a adição desta estatina ao regime TD poderia auxiliar na resposta de pacientes em recidiva ou com MM refratário.

Fromigué et al (2011) demonstraram in vitro que a atorvastatina em combinação com a doxorrubina, reduz a atividade de MMP2 induzida pelo quimioterápico. O tratamento combinado da sinvastatina e análogos da purina em células em cultura de LLC (leucemia linfocítica crônica) potencializou o efeito citostático e, devido a este efeito sinérgico pode-se reduzir a dose de análogos da

purina cuja administração ocasiona diversos efeitos tóxicos graves (Podhoreka et al, 2010).

O efeito das estatinas hidrofílicas, como a pravastatina, em comparação com estatinas hidróbicas parece ser menor, talvez devido a maior facilidade das estatinas hidrofóbicas em penetrar nas células (Wali et al 2009). Otsuki et al (2003) indicam maior potência da sinvastatina, estatina lipofílica, quando comparada aos efeitos da pravastatina.

Coimbra et al (2010) demonstraram que a pravastatina encapsulada em lipossomas foi capaz de inibir o crescimento in vivo do melanoma B16F10-murino em mais de 70% quando comparada com a pravastatina livre que era ineficaz. A pravastatina foi administrada por via subcutânea e a atividade antitumoral pareceu resultar da inibição local do processo inflamatório e da estimulação da resposta imune antitumoral. Estatinas inibem a enzima HMG-CoA redutase, independente de diferenças em suas estruturas químicas, porém diferem na sua meia-vida e lipofilia. Estudos adicionais são necessários para comparar os efeitos promovidos por diferentes estatinas frente a células tumorais. A sensibilidade das células malignas aos efeitos das estatinas também apresenta ampla variação, dependendo de fatores diversos como características genéticas das células tumorais.

Considerações finais

Apesar dos progressos oferecidos pelos novos agentes terapêuticos, com aumento na sobrevivência dos pacientes, e a ampliação dos conhecimentos acerca da biologia da doença, a remissão completa do MM aparentemente está longe de ser obtida. A associação de medicamentos baseados nas características da doença podem gerar novos protocolos terapêuticos adaptados para cada subtipo de MM.

Nesta pesquisa a pravastatina demonstrou efeitos antiproliferativos e antiapoptóticos em células de mieloma múltiplo (MM) em cultura. Além disso, houve redução dos fatores VEGF e bFGF oriundos da secreção autócrina. Estes resultados indicam o potencial anti tumoral da pravastatina, mas estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nestes processos.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas em conjunto no final da dissertação com as demais referências utilizadas.

5 Discussão Geral

O MM é uma neoplasia complexa, com múltiplas alterações genéticas e diversas implicações clínicas. A introdução de novos medicamentos aumentou a sobrevida dos pacientes, mas a remissão completa ainda não foi atingida. O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da pravastatina, pertencente a família das estatinas usualmente empregadas como drogas redutoras de colesterol, sobre células de MM linhagem RPMI 8226. Estatinas apresentam efeitos pleiotrópicos como redução da proliferação celular, indução à apoptose e diminuição da secreção de mediadores inflamatórios, que poderiam ser benéficos no tratamento de pacientes com câncer.

Os efeitos das estatinas em tumores mostraram resultados promissores na leucemia mielóide, câncer de colon, próstata, mama, pulmão, melanoma e glioma (Ghosh- Choudhury, 2010). Outros estudos publicados já haviam relatado resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa, empregando diferentes estatinas e linhagens tumorais diversas. Células de melanoma *in vitro*, tratadas com sinvastatina, ocasionam a redução de células viáveis após 72 horas de tratamento. No mesmo estudo avaliou-se o efeito da sinvastatina sobre o crescimento tumoral *in vivo*, onde se demonstrou redução de 68% no tamanho do tumor após 10 dias de tratamento (Favero et al, 2010).

Millerb et al (2011), atribuem a apoptose induzida pela sinvastatina em células de colangiocarcinoma a desregulação da biossíntese do colesterol, à redução da isoprenilação de GGPP, impedindo a ativação das vias Ras/ERK e Ras/AKT. Os resultados obtidos por Mistafa e Stenius (2009), em três linhagens de câncer de

pâncreas mostraram que a atorvastatina inibe a ativação de Akt, com conseqüente redução da proliferação celular e indução a apoptose.

Yang et al (2011), observou que a apoptose induzida pela lovastatina em células de câncer de próstata in vitro, ocorre devido a interferência na sinalização do receptor androgênico (AR), diminuindo sua expressão e atividade, promovendo queda nos níveis de PSA, inibição do crescimento celular e apoptose. A alteração em AR limita a ativação da sinalização Akt.

A atividade da lovastatina no câncer de mama foi demonstrada em estudo conduzido por Martirosyan et al (2010), onde constatou-se aumento da apoptose induzida pela estatina, através de mecanismo p53 independente. A apoptose ocorreu devido ao bloqueio da atividade da enzima HMG-CoA. Estatinas induzem apoptose através da ativação mitocondrial e as caspases 3 e 9 parecem estar envolvidas e ativadas na via intrínseca da apoptose.

A adição posterior de compostos isoprenóides resgatou a viabilidade celular em culturas de células de MM tratadas com estatinas; portanto pode-se especular que a isoprenilação de pequenas proteínas de ligação GTP são essenciais para regulação da apoptose (Cafforio et al, 2005). A atividade da caspase 3 promoveu a apoptose de células de glioma C6 em cultura, pela inibição da formação de GGPP (Yanae et al, 2011).

Estes efeitos também foram encontrados em estudos com células neoplásicas hematopoiéticas. Sinvastatina e lovastatina inibiram o crescimento celular na leucemia linfocítica crônica, leucemia de células pilosas e linfoma de células imunoblástico. Estatinas são potentes indutores de apoptose de diversos

subtipos de leucemias mielóides agudas. Fluvastatina suprime o crescimento de progenitores CFU-GM in vitro, em linhagens de LMA. Sinvastatina ativa a caspase 9 mitocondrial promovendo apoptose de células na leucemia linfocítica crônica (LLC) (Sassano;Platanias, 2008).

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que a redução do número de células é proporcional à concentração de pravastatina utilizada e o tempo de contato da droga com as células neoplásicas. Minichsdorfer e Hohenegger (2009) demonstraram que a dose utilizada na terapia convencional de estatinas, utilizada na prevenção de doenças cardiovasculares, um a dez nM, não é suficiente para desencadear apoptose de células de melanoma in vitro e, em seu estudo conseguiram induzir apoptose em células de melanoma in vitro usando concentrações de estatinas na ordem de 10 μ M; observaram que doses inferiores a 10 μ M foram ineficientes para ativação das caspases três e nove após tratamento das células por 24 horas. Após 48 horas houve elevação de cinco a dez vezes nas caspases 3 e 9, e ativação da caspase 8. Cafforio et al (2005) também atribuem a indução a apoptose decorrente do uso de estatinas a atividade das caspases 3 e 9. Células mesenquimais do estroma (BMSC) foram tratadas com fluvastatina in vitro e demonstrou-se que essa estatina impede o efeito supressor exercido pelas BMSC sobre a proliferação dos linfócitos T, inibindo a ativação de Rho modificando disposição dos microfilamentos de actina e reduzindo a expressão de moléculas de superfície que estão envolvidas nas interações célula a célula, interferindo na progressão do ciclo celular das BMSC. O tempo de contato com a fluvastatina, apenas 48 horas, não induziu a apoptose nem afetou a produção de IL6 e IL8

pelas BMSC (Musso et al, 2011). Van der Spek et al (2006), demonstraram in vivo, que a dose máxima tolerada de sinvastatina foi de 15 mg/ Kg/ dia em estudo realizado em pacientes com mieloma múltiplo e linfoma.

Vários autores como Millerb et al (2011); Yanga et al (2011), Cafforio et al (2005), Murtola et al (2011) e Mistafa; Stenius (2009) constatam que os efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos das estatinas podem estar vinculados a redução da isoprenilação de pequenas proteínas Ras e Rho responsáveis pela ativação de diversas vias, entre elas Akt, essenciais para manutenção das funções celulares.

Gauthamanan et al (2009) observaram os efeitos das estatinas sobre células estaminais embrionárias humanas com cariótipo normal (HES3 e BG01) e anormal (BG01V) e células de mama com adenocarcinoma (MCF-7); somente as células BG01V e MCF-7 sofreram apoptose, portanto, células não tumorais não foram afetadas pelo tratamento com estatinas.

A sensibilidade das células neoplásicas aos efeitos das estatinas é variável e diversos fatores genéticos e não genéticos podem estar implicados (Medina e Krauss 2010). A desregulação na via do metabolismo lipídico é um fator determinante na sensibilidade à apoptose induzida pelas estatinas (Clendening et al, 2010). Drogas redutoras de colesterol diminuem o risco de câncer de próstata agressivo; o crescimento das células do câncer de próstata e parte de suas vias de sobrevivência dependem de mecanismos bioquímicos que envolvem o colesterol (Freeman; Solomon, 2011). Murtola et al (2011) evidenciaram que concentrações terapêuticas de sinvastatina provocam efeito citostático em células epiteliais de próstata, mas que na presença de LDL extracelular apenas elevadas concentrações

de sinvastatina suprimem o crescimento das células.

O splicing alternativo da enzima HMG-CoA redutase provavelmente constitui um fator essencial para eficácia das estatinas, proporcionando respostas diferenciadas ao tratamento. O splicing alternativo pode ter correlação com várias patologias ou resultar de um mecanismo de variação subjacente em resposta a administração da estatinas (Medina e Krauss, 2010). Clendening et al (2010) sugerem que a desregulação da via mevalonato e da enzima HMG-CoA redutase pode indicar quais são as células sensíveis a apoptose induzida por estatinas. Medina et al (2011) constatou que o splicing alternativo regula os dois principais genes envolvidos na biossíntese do colesterol. Não existem diferenças na expressão da enzima HMGCoA redutase em indivíduos saudáveis e com câncer; sugeriu-se que o risco de se desenvolver câncer colorretal estaria associado a expressão da enzima HMGCoA reductase sem o éxon 13 e que estes pacientes não poderiam se beneficiar da terapia com estatinas (Millerb et al, 2011).

Após avaliação de um painel de linhagens de células de MM, Wong et al (2007) constatou que cerca de 50% delas eram sensíveis a apoptose induzida pela lovastatina, enquanto outra metade se mostrou insensível e concluiu que a sensibilidade a apoptose parece relacionar-se às múltiplas anomalias genéticas que podem estar presentes no MM.

Outro efeito atribuído as drogas da família das estatinas são a inibição da migração celular, invasão e metastatização. Estas propriedades não foram investigadas neste estudo, mas merecem destaque. Comprovou-se que as estatinas inibem a migração celular, invasão, adesão e metástase em células de

melanoma. A expressão aumentada de RHoA-GPT induz a expressão e a atividade de MMPs (metaloproteinases da matriz), que degradam a matriz extracelular, favorecendo a migração das células tumorais. Estatinas reduzem a expressão do RNAm e a atividade enzimática das MMPs, provavelmente através da redução da ativação de Rho (Kidera et al, 2010).

Um estudo *in vitro* mostrou que a atorvastatina reduz a atividade de MMP2 de forma mais efetiva nos modelos que apresentam expressão elevada de MMP2. Observou-se também que o tratamento combinado (atorvastatina + doxorrubicina) foi mais efetivo que a administração de agentes individuais. Os resultados indicam que as estatinas podem aumentar a eficácia dos medicamentos quimioterápicos na invasão celular em osteossarcoma (Fromigué et al, 2008).

Discute-se a aplicação terapêutica das estatinas em cânceres e outras patologias devido a toxicidade de doses mais elevadas que, segundo indicam os estudos, poderiam ser administradas em combinação com outras drogas para obtenção dos efeitos desejados com doses abaixo do limiar tóxico. Esta abordagem terapêutica foi avaliada em estudo conduzido por Wali et al (2009) onde testou-se uma combinação de estatinas mais tocotrienol. Ambas inibem a enzima HMG-CoA reductase, proporcionando os mesmos efeitos. As drogas foram capazes de interferir no ciclo celular, aprisionando células mamárias malignas na fase G1. O tratamento combinado das duas drogas permitiu reduzir bastante as doses de ambas, cerca de 0,25 mMol de estatinas + 2mM de tocotrienol) abaixo dos níveis considerados tóxicos (Wali et al, 2009). A lovastatina associada à doxorrubicina promoveu a potencialização da apoptose devido a elevação do nível de

doxorrubicina dentro das células resistentes, pois a lovastatina ocasionou a retenção intracelular e a ação genotóxica do doxorrubicina (Martirosyan et al, 2010). A associação da atorvastatina com Gemcitabina, citostático utilizado no tratamento do câncer de pâncreas, potencializou os efeitos promovidos pelo quimioterápico devido a inibição da via Akt, comumente alterada no câncer pancreático (Mistafa; Stenius, 2009).

A associação fluvastatina e cisplatina foi testada em células de câncer de ovário in vitro e demonstrou efeito sinérgico, reduzindo significativamente a proliferação celular quando comparada a atividade isolada da cisplatina (Taylor-Harding et al, 2010)

Estudos in vitro evidenciam a atividade da pravastatina na redução da proliferação tumoral, porém as doses necessárias para obtenção deste efeito são muito superiores às concentrações empregadas na redução dos níveis de colesterol. O sistema de lipossomas eleva as concentrações da estatina no local do tumor, bem como aumenta o tempo de permanência da droga no local de ação, provavelmente devido ao longo tempo de circulação dos lipossomas. O sistema mononuclear fagocitário fagocita os lipossomas e altas concentrações de estatinas permanecem internalizadas nos macrófagos interferindo com sua função (Coimbra et al, 2010).

A pravastatina, estatina utilizada nesta pesquisa, já foi objeto de estudo de vários autores, evidenciando diversos efeitos em diferentes linhagens neoplásicas. No Reino Unido indivíduos em uso de estatinas foram acompanhados durante seis anos e não se encontrou associação evidente entre estatinas e risco de câncer;

exceto no câncer de esôfago onde houve redução do risco, no câncer de cólon onde ocorreu aparente redução do risco em indivíduos que utilizavam pravastatina (Hippisley-Cox e Coupland, 2010). Pravastatina foi administrada a pacientes com carcinoma hepatocelular avançado e aumentou a sobrevida mediana dos pacientes em 18 meses em comparação com o grupo controle, em que não houve administração de estatinas, evidenciando sua utilidade como tratamento adjuvante (Yamasaki et al, 2001). A administração sub-cutânea de pravastatina lipossomal, no local de crescimento de células de melanoma B16F10-murino reduziu o crescimento tumoral, quando a pravastatina na forma livre não mostrou efeitos antiproliferativos. A pravastatina pode ser encapsulada em lipossomas porque é hidrofílica. Não houve redução em níveis de colesterol circulante, mas ocorreu a redução de vários mediadores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos (Coimbra et al, 2010).

Estatinas podem interferir na secreção de fatores de crescimento, podendo limitar a expansão do tumor. Diversos fatores estão implicados na patogênese do MM, entre eles IL6, VEGF, TGF β e bFGF, que são produzidos pelas células do microambiente da medula óssea e pelas próprias células tumorais. A secreção pelas células do MM (autócrina) destes fatores foi demonstrada através de cultivo celular das células de MM linhagem RPMI 8226. Os fatores de crescimento foram quantificados no sobrenadante do cultivo celular, através do método de ELISA, mostrando níveis significativos destes fatores.

Neste estudo observou-se redução dos fatores de crescimento VEGF e bFGF quando comparados com o controle. Não ocorreu diminuição expressiva nos

níveis de IL6 e TGF β . Otsuki et al (2003), realizou estudo semelhante, avaliando o efeito da pravastatina sobre a secreção de IL6 e seus resultados foram semelhantes aos obtidos neste trabalho. Oka et al (2008) acompanhou um grupo de 48 pacientes divididos em dois grupos, sendo que um deles recebeu diariamente atorvastatina. Os indivíduos apresentavam doença arterial coronariana e dislipidemia e se observou que os níveis de IL-6 sofreram queda gradativa, porém não significativa após 12 semanas.

Estatinas inibiram a expressão dos fatores de crescimento bFGF, HGF e TGF β em células de osteossarcoma, através da redução na produção de GGPP que impede a localização celular de Ras e a ativação de MERK/ERK e AKT (Tsubakia et al, 2011).

Os resultados obtidos nesta pesquisa encorajam o prosseguimento das investigações sobre os efeitos das estatinas em doenças neoplásicas como monoterapia ou em tratamentos combinados, rastreando possíveis efeitos colaterais e determinando a dose segura para cada tratamento. Outras linhagens de MM devem ser estudadas, uma vez que a heterogeneidade das anomalias genéticas nesta neoplasia cria subtipos específicos de MM, com características peculiares na progressão da doença, na formação de metástases e na resposta aos medicamentos empregados.

6 Considerações finais

Os resultados deste trabalho reforçam os efeitos antitumorais atribuídos às estatinas. A pravastatina diminuiu a proliferação celular, aumentou o número de células na fase G0/G1 do ciclo celular e reduziu os níveis dos fatores VEGF e bFGF produzidos pelas células de MM.

Os dados obtidos nesta pesquisa, em conjunto com outras publicações na área, mostram resultados promissores na utilização de estatinas na terapêutica anti tumoral. Novos estudos devem ser conduzidos com intuito de evidenciar os mecanismos subjacentes a estes efeitos, ao ajuste da dose e a toxicidade da terapia a longo prazo.

7 Referências Bibliográficas

- ABDI, J. et al. The role of Toll-like receptor mediated signalling in the pathogenesis of multiple myeloma. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 80, p. 225-240, 2011.
- AGGARWAL B. B.; GEHLOT P. Inflammation and Cancer: How friendly is the relationship for câncer patients? **Current Opinion Pharmacological**, v.9, p. 351-369, 2009.
- AGUAYO, A. et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 96, p. 2240-2245, 2000.
- AHN K. S., SETHI, G. e AGGARWAL, B. B. Reversal of Chemoresistance and Enhancement of Apoptosis by Statins Through Downregulation of the NF- κ B pathway. **Biochemistry Pharmacology**, v. 75, p. 907-913, 2008.
- ANDERSON, K. C. et al. Response pattern of purified myeloma cells to hematopoietic growth factors. **Blood**, v. 73, p. 1915-1924, 1989.
- ARA, T.; DECLERCK, Y. Interleukin-6 in bone metastasis and câncer progression. **European Journal of Haematology**, v. 46, p. 1223-1231, 2010.
- BALAKUMARAN, A. et al. Bone marrow microenvironment in myelomagenesis: its potential role in early diagnosis. **Expert review of molecular diagnosis**, v. 10, p. 465-480, 2011.
- BASAK, G. W.; CARRIER, E. The search for multiple myeloma stem cells: the long and winding Road. **Biology of Blood and marrow transplantation**, v. 16, p. 587-594, 2010.
- BEN-NERIAH, Y.; KARIN, M. Inflammation meets câncer, with NF- κ B as the matchmaker. **Nature Immunology**, v. 12, p. 715-723, 2011.
- BLADÉ, J.; CIBEIRA, M. T.; ROSIÑOL L. Novel drugs of the treatment of multiple myeloma. **Haematologica**, v. 95, p. 702-704, 2010.
- BOMMERT, K. et al. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. **Eur J Cancer**, v. 42, p. 1574-1580, 2006.
- BORGQUIST, S. et al. Prognostic impact of tumour-specific HMG-CoA reductase expression in primary breast câncer. **Breast Cancer Research**, v. 10, 2008.

BOUDREAU, D. M. et al. Statin Use and Cancer Risk: A Comprehensive Review. **Expert Opin Drug Safety**, v. 9, p. 603–621, 2010.

CAFFORIO, P. et al. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. **Carcinogenesis**, v. 6, p.883-891, 2005.

CAOA, Y. et al, The cytokine/chemokine pattern in the bone marrow environment of multiple myeloma patients. **Experimental Hematology**, v. 38, p. 860-867, 2010.

CHAUHAN, D. et al. Multiple myeloma cell adhesion- induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. **Blood**, v. 87, p. 1104-1112, 1996.

CHEN, H. et al. Pleiotrophin produced by multiple myeloma induces transdifferentiation of monocytes into vascular endothelial cells: a novel mechanism of tumor induced vasculogenesis. **BLOOD**, v. 113, p. 1992-2002, 2009.

CHNG, W. J. et al. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v. 20, p. 571-596, 2007.

CHO, S. J. et al. Simvastatin induces apoptosis in human colon câncer cells and in tumour xenografts, and attenuates colitis-associated colon câncer in mice. **International Journal of Cancer**, v. 123, p. 951-957, 2008.

CLENDENING, J. W. et al. Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. **National Academy of Sciences of the America**, v. 107, p. 15051-15056, 2010.

CLENDENING, J. W. Studies of the isoprenoid mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to câncer chemotherapy and chemoprevention. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, p.567-585, 2004.

COIMBRA, M. et al. Liposomal pravastatin inhibits tumor growth by targeting câncer related inflammation. **Journal of Controlled Release**, v. 148, p. 303-310, 2010.

DANKBAR B. et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple mieloma. **Blood**, v.95, p. 2630-2636, 2000.

DEBOSE-BOYD, R. Feedback Regulation of Cholesterol Synthesis Sterol-Accelerated Ubiquitination and Degradation of HMG CoA Reductase. **Cell Research**, v. 18, p. 609–621, 2008.

DECAUX, O. et al. Prediction of Survival in Multiple Myeloma Based on Gene Expression Profiles Reveals Cell Cycle and Chromosomal Instability Signatures in High-Risk Patients and Hyperdiploid Signatures in Low-Risk Patients: A Study of the Intergroupe Francophone du Myélome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 4798-4805, 2008.

DEMCHENKO, Y. N. et al. Classical and/or alternative NF- κ B pathway activation in multiple myeloma. **BLOOD**, v. 115, p. 3541-3552, 2010.

DICKENS, N. J. et al. Homozygous deletion mapping in myeloma samples identifies genes and expression signature relevant to pathogenesis and outcome. **Clinical Cancer Research**, v. 16, p.1856-1864, 2010.

DIMOPOULOS, A. C. et al. VMP (Bortezomib, Melphalan, and Prednisone) is active and well tolerated in newly diagnosed patients with multiple myeloma with moderately impaired renal function, and results in reversal of renal impairment: cohort analysis of the phase III vista Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p. 6086-6093, 2009.

DONG, X. et al. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hematologic malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 62, p. 105-118, 2007.

ENDO, A. The Discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **Journal of lipid research**, v. 33, 1992.

FAVERO, G. et al. Simvastatin impairs murine melanoma growth. **Lipids in health and disease**, v. 16, 2010.

FAN, F. et al. Targeting the tumor microenvironment: Focus on angiogenesis. **Journal of Oncology**, 2011.

FIEDLER, W. et al. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 89, p. 1870-1875, 1997.

FONSECA, R. et al. International myeloma working group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. **Leukemia**, v. 23, p. 2210-2221, 2009.

FREEMAN, M. R.; SOLOMON, K. R. Cholesterol and benign prostate disease. **Differentiation**, v. 82, p. 244-252, 2011.

FRESHNEY R.I. **Culture of animals cells: a manual of basic technique**. 3 ed. New York, Welly-Liss, 1994.

FROMIGUÉ, O.; HAMIDOUCHE, Z.; MARIE, P. J. Statin-induced inhibition of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase sensitizes human osteosarcoma cells to anticancer drugs. **The Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, p. 595-600, 2008.

FUKUDOME, K. et al. Hyperlipidemia associated with multiple myeloma. **Internal medicine**, v. 35, p. 337-340, 1996.

GADÓ, K. et al. Mouse plasmocytoma: experimental model of human multiple myeloma. **Haematologica**, v. 86, p. 227-236, 2001.

GAUTHAMAN, K.; MANASI, M; BONGSO, A. Statins inhibit the growth of variant human embryonic stem cells and cancer cells in vitro but not normal human embryonic stem cells. **Journal British Pharmacology**, v. 157, p. 962 – 973, 2009.

GHOSH, N.; MATSUI, W. Cancer stem cells in multiple myeloma. **Cancer Letters**, v. 277, p. 1-7, 2009.

GHOSH-CHOUDHURY, N. et al. Simvastatin induces depression of PTEN expression via NF- κ B to inhibit breast cancer cell growth. **Cell Signal**, v. 22, p. 749-758, 2010.

GIRALT, S. Stem cell transplantation for multiple myeloma: current and future status. **American Society Hematology of Education Book**, v. 2011, p. 191-196, 2011.

GIULIANI, N.; RIZZOLI, V. Myeloma cells and bone marrow osteoblast interactions: role in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. **Leukemia & Lymphoma**, v. 48, p. 2323-2329, 2007.

GLYNN, S et al. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. **BMC Cancer**, v. 8, 2008.

GRECO et al. Reduction of serum IGF-I levels in patients affected with monoclonal gammopathies of undetermined significance or multiple myeloma. Comparison with bFGF, VEGF and k-ras gene mutation. **J. Exp. Clin Res.**, v. 28, p.35, 2009.

GREENWOOD, J. et al. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 358-370, 2006.

GRIVENNIKOV, S. et al. Immunity, inflammation and cancer. **CELL**, v. 140, p. 883-899, 2010.

HADARI, Y.; SCHLESSINGER, J. FGFR3 - targeted mAb therapy for bladder cancer and multiple myeloma. **Journal Clinical Invest.**, v. 119, p. 1077-1079, 2009.

HAROUSSEAU, J. L.; DREYLING, M; ON BEHALF OF THE ESMO. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **ANNALS OF ONCOLOGY**, v. 19, p. 155-157, 2010.

HARTLEY-BROWN, M.; SULLIVAN, D.; BAZ, R. State-of-the Art management of complications of myeloma and its treatment. **Advances in hematology**, v. 2010, 2010.

HEMPEL, N. et al. Expression of the type III TGF- β receptor is negatively regulated by TGF- β . **Carcinogenesis**, v. 29, p. 905-912, 2008.

HERRERO-MARTIM, G.; LOPEZ-RIVAS, A. Statins activate a mitochondria-operated pathway of apoptosis in breast tumor cells by a mechanism regulated by ErbB2 and dependent on the prenylation of proteins. **FEBS Letters**, v. 582, p. 2589-2590, 2008.

HIDESHIMA T. Et al. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. **Blood**, v. 104, p. 607-618, 2004.

HIPPISLEY-COX, J; COUPLAND, C. Unintended effects of statin in men and women in England and Wales: population based cohort study using the QResearch database. **British Medical Journal**, v. 340, 2010.

HIRSCH, H. A. et al. A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. **Cancer Cell**, v. 13, p. 348-36, 2010.

HIRUMA, Y et al. Increased signaling through p62 in the marrow microenvironment increases myeloma cell growth and osteoclast formation. **BLOOD**, v. 14, p. 4894-4902, 2009.

HUANG, Y. et al, 2007. Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. **BLOOD**, v. 110, p. 624 - 631, 2007.

HUFF, C. A.; MATSUI, W. Multiple myeloma stem cell cancer. **Journal Clinical Oncology** v. 26, p. 2895-2900, 2008.

HUS, M. et al. Thalidomide, dexamethasone and lovastatin with autologous stem cell transplantation as a salvage immunomodulatory therapy in patients with autologous

refractoty multiple myeloma. **Annals of Hematology**, v. 90, p. 1161-1166, 2011.

HUTCHISON C. A. et al. Treatment of acute renal failure secondary to multiple myeloma with chemotherapy and extended high cut-off hemodialysis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, p. 745-754, 2009.

ISHIKAWA, H. et al. Mitogenic signals initiated via inteleukin-6 receptor complexes in corporation with other transmembrane molecules in myelomas. **J. Clin. Exp. Hematopathol**, v. 46, p. 55-66, 2006.

JAUMDALLY, R. J. et al. Effects of atorvastatin on circulating CD34+/CD133+/CD45- progenitor cells and indices of angiogenesis (vascular endothelial growth factor and the angiopoietins 1 and 2) in atherosclerotic vascular disease and diabetes mellitus. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, p. 385-393, 2010.

KHAIDAKOV, M. et al. Oxidized LDL receptor 1 (OLR1) as a possible link between obesity, dyslipidemia and câncer. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

KALUSHKOVA, A. et al. Polycomb target genes are silenced in multiple myeloma. **PLoS One**, v. 5, 2010.

KAWANO, M. et al. Autocrine generation and essential requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myeloma. **Nature**, v. 332, p. 83-85, 1988.

KIDERA, Y. et al. Reduction of lung metastasis, cell invasion, and adhesion in mouse melanoma by statin-induced bleckade of the Rho/Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase. **Journal Exp Clin Cancer Research**, v. 9, 2010.

KLAWITTER J. et al. Effects of lovastatin on breast câncer cell: a proteo- metabonomic study. **Breast câncer Research**, v. 12, 2010.

KLEIN B. et al. Production of growth factors by human Myeloma cells. **Cancer Research**, v. 47, p. 4856-4860, 1987.

KLEIN, B. et al. Interleukin-6 in human multiple myeloma. **Blood**, v. 85, p.863-8572, 1995.

KLEIN B. et al. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin- 6. **Blood**, v. 73, p. 517-526, 1989.

KOHLI, P.; CANNON, C. P. Statins and safety: can we finally reassured? **The Lancet**, v. 378, p. 1980-1981, 2011.

KWANG S. A. et al. Simvastatin, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, suppresses osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand through modulation of NF- κ B pathway. **International Journal of Cancer**, V. 123, p. 1733-1740, 2008.

KOVACS, E. Investigation of the proliferation, apoptosis/necrosis, and cell cycle phases in several human multiple myeloma cell lines. Comparison of Viscum album QuFrF Extract with vincristine in na in vitro model. **The Scientific World Journal**, v. 10, p.311-320, 2010.

KUEHL W. M. BERGSAGEL P. L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. **In Situ**, 2002.

LABRIDINIS, A. et al. Apo2L/TRAIL innibits tumor growth and bone destruction in a murine modelo of multiple myeloma. **Clinical Cancer Research**, v. 15, 2009.

LAMBERT K. E. The type III transforming growth factor β receptor inhibits proliferation, migration and adhesion in human myeloma cells. **Molecular Biology of The Cell**, v. 22, p. 1463-1472, 2011.

LANDGREN, O. et al. Obesity is associated with na increased risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance among black and white women. **BLOOD**, v. 116, p.1056-1059, 2010.

LANDGREN, O. Monoclonal gammopathy of Undetermined significance and smoldering myeloma: new insights into pathophysiology and epidemiology. **American Society of Hematology Education Program Book**, v. 1, p. 295-302, 2010.

LEE, K. J. et al. Immune regulatory effects of simvastatin on regulatory T cell – mediated tumour immune tolerance. **British Society for Immunology**, 2010.

LICHTMAN, A. M. et al. Obesity and the Risk for a Hematological Malignancy: Leukemia, Lymphoma, or Myeloma. **The Oncologist**, v.10, p. 1083-1101, 2010.

LUDWIG, H. et al. Current Multiple Myeloma Treatment Strategies with Novel Agents: A European Perspective. **The Oncologist**, 2010.

MA, S.; MA, C. C. Recent development in pleiotropics effects of statins on cardiovascular disease trhrough regulation of transforming growth factor-beta superfamily. **Cytokine e Growth Factor Review**, v. 22, p. 167-175, 2011.

MALICKI, S. et al. IL-6 and IL-8 responses of colorectal cancer in vivo and *in vitro* cancer cells subjected to simvastatin. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 60, p. 141-146, 2009.

MARTIROSYAN, A. et al. Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance. **BMC cancer**, v. 10, 2010.

MEDINA, M. W. The relationship between HMGCR genetic variation alternative splicing and statin efficacy. **Discovery Medicine**, v. 9, p. 495-499, 2010.

MEDINA, M. W.; KRAUSS, R. M. The role of HMGCR alternative splicing in statin efficacy. **Trends Cardiovascular Medicine**, v. 19, p.173-177, 2009.

MEDINA, M. W. et al. Coordinately regulated alternative splicing of genes involved on cholesterol biosynthesis and uptake. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

MEDINGER, M; FISCHER, N; TZANKOV, A. Vascular endothelial growth factor-related pathways in hemato-lymphoid malignancies. **Journal of Oncology**, v. 2010, 2010.

MEINEL, F. G. et al. The novel proteasome-independent NF-kappa B inhibitor V1810 induces apoptosis and cell cycle arrest in multiple myeloma and overcomes NF-kB-mediated drug resistance. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, p. 300-310, 2010.

MILLERB, T. et al. Simvastatin stimulates apoptosis in cholangiocarcinoma by inhibition of Rac 1 activity. **Digestive and liver disease**, v. 43, p. 395-403, 2011.

MINICHSDORFER, C; HOHENEGGER, M. Autocrine amplification loop in statin-induced apoptosis of human melanoma cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, p. 1278-1290, 2009.

MINOWADA, J. et al. The Presence of the Epstein-Barr Viral Genome in Human Lymphoblastoid B-Cell Lines and Its Absence in a Myeloma Cell Line¹. **Cancer Research**, v.34, p. 1898-1903, 1974.

MOLOKHIA, M. et al. Statin induced myopathy and myalgia: time trend analyses and comparison of risk associated with statin class from 1991-2006. **PLoS ONE**, v. 3, 2008.

MOORE, G. E.; KITAMURA, H. Cell line derived from patient with myeloma. New York State. **Journal of Medicine**, v. 68, p. 2054-2060, 1968.

MURTOLA, T. J. et al. Comparative effects of high and low-dose simvastatin on prostate epithelial cells: the role of LDL. **European Journal of Pharmacology**, v.673, p. 96-100, 2011.

MUSSO, A.; ZOCCHI, M. R.; POGGI, A. Relevance of the mevalonate biosynthetic pathway in the regulation of bone marrow mesenchymal stromal cell-mediated effects on T-cell proliferation and B-cell survival. **Haematologica**, v. 96, p. 16-23, 2011.

MISTAFA, O.; STENIUS, U. Statins inhibits Akt/ PKB signaling via P2X7 receptor in pancreatic câncer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 1115-1126, 2009.

NADAV-DAGAN, L. et al. Adhesive interactions regulate transcriptional diversity in malignant B cells. **Molecular Cancer Research**, v. 8, p. 482-493, 2010.

OCIO, E. M.; SAN MIGUEL J. The DAC system and associations with multiple myeloma. **Invest new drugs**, v. 28, p. 28-35, 2010.

OKA, H. et al. Atorvastatin induces associated reductions in platelet P-selectin, oxidized low-density lipoprotein, and interleukin-6 in patients with coronary artery diseases. **Heart and Vessels**, v. 23, p. 249-256, 2008.

OTSUKI, T. et al. IL-6 a key factor in growth inhibition of human myeloma cells induced by pravastatin, en HMG-CoA reductase inhibitor. **International journal of Oncology**, v. 26, p. 763-768, 2003.

OTSUKI, T. et al. Effects of an HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin, on human myeloma cells. *Oncology reports*, v. 11, p. 1053-1058, 2004.

PAPADOPOULUS, G. et al. Statins and prostate câncer: molecular and clinical aspects. **European Journal of Cancer**, v. 47, p. 819-830, 2011.

PENG et al. Drug Inhibition Profile Prediction for NFkB Pathway in Multiple Myeloma. **Public library of Science**, v. 6, 2011.

PEREIRA, J. et al. Papel da Célula Endotelial em Neoplasias Malignas Hematológicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 223-228, 2008.

PODHORECKA, M. et al. Simvastatin and purine analogs have a synergic effect on apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. **Annals Hematology**, v. 89, p. 1115-1124, 2010.

QING, J. et al. Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 1216-1229, 2009.

QUACH, H.; PRINCE, H. M.; SPENCER A. Managing multiple myeloma in the elderly: are we making progress? **Expert review of Hematology**, v. 4, p. 301-315, 2011.

RAAB, M. S. et al. Multiple myeloma. **The Lancet**, v. 374, p. 324-339, 2009.

RAJKUMAR, S. V. et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. **Clin Cancer Res**, v. 6, p. 3111-3116, 2000.

RAIMONDO, F. D. et al. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. **Haematologica**, v. 85, p. 800-805, 2000.

REDZEPOVIC, J. et al. Multiple myeloma management. **The Journal of International Medical Research**, v. 36, p.371-386, 2008.

RIBATTI, D. et al. Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphoma. An immunohistochemical and ultrastructural study. **Eur J Haematol**, v. 56, p. 45-53, 1996.

RICHARDSON, P. G. et al. Managing multiple myeloma: the emerging role of novel therapies and adapting combination treatment for higher risk settings. **British Journal of Haematology**, v. 154, p. 755-763, 2011.

RIGANTI, C. et al. Atorvastatin modulates anti proliferative and pro-proliferative signals in Her2/neu-positive mamary cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 1079-1089, 2011.

ROLAND, C. L. et al. Cytokine levels correlate with immune cell infiltration after anti-VEGF therapy in preclinical mouse models of breast cancer. **Public Library of Science**, v. 4, 2009.

ROODMAN, G. D.; DOUGALL, W. C. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, p. 92-101, 2008.

ROY, M. et al. Statins and prostate cancer: role of cholesterol inhibition vs. prevention of small GTP-binding proteins. **American Journal Cancer Research**, v. 1, p. 542-561, 2011.

RUSHWORTH, S. A. et al. Understanding the role of miRNA in regulating NF- κ B in blood cancer. **American Journal Cancer Research**, v. 2, p. 65-74, 2011.

SAMADDER, N. J. et al. Risk of colorectal cancer in self-reported inflammatory bowel disease and modification of risk by statin and NSAID use. **Cancer**, v. 117, p. 1640-1648, 2011.

SAN-MIGUEL, J. F.; MATEOS, M. Can multiple myeloma become a curable disease. **Haematologica**, v. 96, p. 1246-1248, 2011.

SASSANO, A. et al. Suppressive effects of statin on acute promyelocytic leukemia cells. **Cancer Research**, v. 67, p. 4524-4532, 2007.

SASSANO, A.; PLATANIAS, L. C. Statins in tumor suppression. **Cancer Letters**, v. 260, p. 11-19, 2008.

SCHMIDMAIER, R. First clinical experience with simvastatin to overcome drug resistance in refractory multiple myeloma. **European Journal of Haematology**, v. 79, p. 240-234, 2007.

SETHI, G. et al. Nuclear factor-kB activation: from beach to beside. **Exp. Biol. Med.**, v. 233, p. 21-31, 2008.

SEZER, O. et al. Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. **Annals Hematology**, v. 70, p. 574-577, 2000.

SFIRIDAKI, A. et al. Angiogenesis-related cytokines, RANKL and osteoprotegerin in multiple myeloma patients in relation to clinical features and response to treatment. **Mediators Inflammation**, v. 2011, 2011.

SFIRIDAKI, A. et al. Circulating osteopontin a dual marker of bone destruction and angiogenesis in patients with multiple myeloma. **Journal Haematology Oncology**, v. 44, 2011.

SHIMONI, A. et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced conditioning in patients with refractory and recurrent multiple myeloma. **Cancer**, v. 116, p. 3621-3630, 2010.

STRINGER, S. et al. Recent advances in the pathogenesis and management of cast nephropathy (Myeloma kidney). **Bone Marrow Research**, v. 2011, 2011.

TAGOUG, I.; DE CHALON S.; DUMONTET, C. Inhibition of IGF-1 Signalling Enhances the Apoptotic Effect of AS602868, an IKK2 Inhibitor, in Multiple Myeloma Cell Lines. **Public Library of Science**, v. 6, 2011.

TAKEUCH, K. et al. TGF- β inhibition restores terminal osteoblast differentiation to suppress myeloma growth. **Public library of science**, v. 5, 2010.

TANAKA, Y. et al. Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for vascular endothelial cell growth factor and osteopontin. **Clinical Cancer Research**, v. 13, p. 816-823, 2007.

TANCRED, T. M. et al. Altered expression of fibronectin and collagens I and IV in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 57, p. 239-247, 2009.

TAVERNA, C. et al. Integrating novel agents into multiple myeloma treatment – current status in Switzerland and treatment recommendations. **Swiss medical Weekly**, v. 140, 2010.

TAYLOR-HARDING, B. et al. Fluvastatin and cisplatin demonstrate synergistic cytotoxicity in epithelial ovarian cancer cells. **Gynecologic Oncology**, v. 119, p. 549-556, 2010.

TAWARA, K. et al. Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone: potential of anti-IL-6 therapies. **Cancer Management and Research**, v. 3, p. 177-189, 2011.

THU, Y. M.; RICHMOND, A. NF- κ B inducing kinase: a key regulator in the immune system and a cancer. **Cytokine e Growth Factor Reviews**, v. 21, p. 213-226, 2010.

TIJERAS-RABALLAND, A. et al. Rosuvastatin counteracts vessel arterialisatation and sinusoid capillarisation, reduces tumour growth, and prolongs survival in murine hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2010, 14 pages, 2010.

TROMPET, et al. High Innate Production Capacity of Proinflammatory Cytokines Increases Risk for Death from Cancer: Results of the PROSPER Study. **Clinical Cancer Research**, v. 15, p. 7744-7748, 2009.

TSUBAKIA, M. et al. Blockade of the Ras/MEK/ERK and Ras/PI3K/AKT pathways by statins reduces the expression of bFGF, HGF and TGF β as angiogenic factors in mouse osteosarcoma. **Cytokine**, v. 54, p. 100-107, 2011.

TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nature Review Cancer**, v. 10, p. 116-129, 2010.

UCHIYAMA, H. et al. Adhesion of human myeloma derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. **Blood**, v. 82, p. 3712-3720, 1993.

UCHIYAMA, H. et al. Characterization of adhesion molecules on human myeloma cell lines. **Blood**, v. 80, p. 2306-2314, 1992.

URASHIMA, M. et al. Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells. **Blood**, v. 87, p. 1928–1938, 1996.

VAKLASAVA, C.; CHATZIZISIS Y. S.; TSIMBERIDOUA, A. M. Common cardiovascular medications in cancer therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 130, p. 177-190, 2011.

VALCKENBORGH, E. V. Murine 5T multiple myeloma cells induce angiogenesis in vitro and in vivo. **British Journal of Cancer**, v. 88, p. 796-802, 2002.

VAN DER SPEK, E. et al. Dose-finding study of high-dose simvastatin combined with standard chemotherapy in patients with relapsed or refractory myeloma or lymphoma. **Haematologica**, v. 91, p. 542-545, 2006.

XIANG, Y. et al. Monitoring a nuclear factor-kB signature of drug resistance in multiple myeloma. **Molecular e Celular Proteomic**, v. 10, 2011.

WALI V. B. et al. Combined treatment of gamma-tocotrienol with statins induces mammary tumor cell cycle arrest in G1. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, p. 639-650, 2009.

WALKER, B. A.; MORGAN G. J. Could DNA methylation become a useful measure of multiple myeloma prognoses? **Expert Review of Hematology**, v. 4, p. 125-127, 2011.

WANG, Y. C.; LIU, P. Y.; LIAO, J. K. Pleiotropic effects of astatin therapy molecular mechanisms and clinical results. **Trends Molecular Medicine**, v. 14, p. 37-44, 2008.

WANGA, Y. et al. The effect of atorvastatin on mRNA levels of inflammatory genes expression in human peripheral blood lymphocytes by DNA microarray. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 65, p. 118-122, 2011.

WEISS, B.; KUEHL, M. Advances in understanding gammopathy of undetermined significance as a precursor of multiple myeloma. **Expert Review of Hematology**, v. 3, p. 165-174, 2010.

WEISS, B. et al. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. **BLOOD**, v. 113, p.5418-5422, 2009.

WOLIN, K. Y.; CARSON, K.; COLDITZ, G. A. Obesity and Cancer. **The Oncologist**, v. 15, p.556-565, 2010.

WONG, W. W. et al. Determinantes of sensitivity to lovastatin-induced apoptosis in multiple myeloma. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, p. 1886-1897, 2007.

YANAE, M. et al. Statin-induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and AKT activation by inhibition of the geranylgeranyl-pyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.30, 2011.

YANG, L. et al. Platelet factor 4 and its p17-70 peptide inhibit myeloma proliferation and angiogenesis in vivo. **Biomed Central Cancer**, v. 11, 2011.

YAMASAKI, W. S. et al. Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled Trial. **British Journal of Cancer**, v. 84, p. 886-891, 2001.

ZAMARRON, B. F.; CHEN, W. J. Dual roles of immune cells and their factors in câncer development and progression. **International Journal Biology Sciences**, v. 7, p. 651-658, 2011.

ZHAN, F. et al. The molecular classification of multiple myeloma. **BLOOD**, v. 108, p. 2020-2028, 2006.

ZHONG, W. et al. Lovastatin inhibits proliferation of anaplastic thyroid câncer cells through up-regulation of p27 by interfering with the Rho/ROCK-mediated pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 1663-1672, 2011.

ZIPORI, D. The hematopoietic stem cell niche versus microenvironment of the multiple myeloma tumor initiating cell. **Cancer Microenviron**, v.3, p.15-28, 2010.

ZLEIA, M. B. Characterization of in vitro growth of multiple myeloma cells múltiplo. **Experimental Hematology**, v. 35, p. 1550–1561, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Protocolo fases do ciclo celular

- Separar 10^6 células.
- Centrifugar os tubos com amostras em etanol 70% por 5 minutos, a 2.000 rpm.
- Descartar o etanol, vertendo os tubos.
- Ressuspender o pellet em 200 μ l de PBS 1x, e transferir as amostras para uma placa cônica de 96w, ou para eppendorfs.
- Centrifugar a placa por 5 minutos a 2.000rpm
- Aspirar o sobrenadante e ressuspender em PBS1x e centrifugar novamente
- Aspirar o sobrenadante e ressuspender em 200 μ l em solução de PI
- Deixar 30 minutos à temperatura ambiente protegido da luz, ou à 37⁰C por 15 minutos
- Transferir as amostras para os tubos de FACs

ANÁLISE NA FACScalibur

CELL QUEST

- Abrir um histograma ou um dot/density plot.
- Escolher um dot plot: analysis.
- Escolher em file o arquivo desejado.
- Escolher em parameter: FL2-H ou o fotomultiplicador desejado, no caso de histograma; ou escolher x parameter e y parameter desejados no caso de dot.
- Para analisar histograma ou dots:
 - Escolha marcador (M) ou quadrantes e delimitar regiões desejadas
 - Abrir STATS, e escolher region stats ou quadrant stats

APÊNDICE 2 – Procedimento para determinação dos níveis de IL-6 e TGF β no sobrenadante da cultura de células de MM utilizando o Kit eBioscience (protocolo A Ready set Go ELISA)

Procedimento

1. Diluir o anticorpo de captura em tampão de revestimento 1x tal como consta no Certificado de Análise fornecido com o conjunto.
Nota importante: Deixar o tampão de revestimento à temperatura ambiente antes da diluição em água de grau reagente.
2. Colocar 100 μ L / poço de anticorpo de captura na placa de ELISA.
3. Selar a placa e incubar durante a noite a 4 °C.
4. No dia seguinte, preparar o Diluente de Ensaio. Diluir o diluente concentrado 5x. Caso necessite estocar prepare apenas o reagente de trabalho: 10 ml Diluente do ensaio concentrado mais 40 mL de água grau reagente)
5. Retirar a placa da temperatura de 4 °C e aspirar seu conteúdo e lavar 3-5 vezes com tampão de utilizando 300 μ L / poço. Permitir que um "molho" de tempo (30-60 segundos) para cada etapa de lavagem. Inverta a placa em papel absorvente para remover qualquer tampão residual.
6. Acrescente 200 μ L / poço do Diluente de Ensaio. Cobrir ou selar a placa e incubar à temperatura ambiente durante 1 hora.
7. Aspirar os poços e lavar 3-4 vezes com, pelo menos, 300 μ L de Tampão de Lavagem / poço. Inverta a placa e blot em papel absorvente para remover qualquer tampão residual.
8. Use Diluente de ensaio para diluir os padrões recombinantes como observado na CofA.
9. A adição de 100 μ L / poço dos padrões e as amostras é completado nos poços destinados a eles. Cobrir ou selar a placa e incubar à temperatura ambiente durante 2 horas (ou durante a noite a 4 °C para a sensibilidade máxima).
10. Durante a incubação de amostras padrão /, preparar o anticorpo de detecção como instruído no CofA.
11. Aspirar os poços e lavar pelo menos 5 vezes com 300 μ L / poço de lavagem. Permitir que um "molho" de tempo (30-60 segundos) para cada etapa de lavagem. Inverta a placa em papel absorvente para remover qualquer tampão residual.
12. Adicionar 100 μ L / poço de anticorpo de detecção. Cobrir e incubar à temperatura ambiente durante 1 hora.
13. Durante a incubação, preparar a solução avidina-HRP como indicado no CofA.
14. Aspirar dos poços e lavar 5 vezes com pelo menos 300 μ L de Tampão de Lavagem / poço. Permitir que um "molho" de tempo (30-60 segundos) para cada etapa de lavagem. Inverta a placa e blot em papel absorvente para remover qualquer tampão residual.
15. Adicionar 100 μ L / poço de preparada avidina-HRP. Selar a placa e incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos. Nota: Não incluem azida de sódio em todos os buffers, pois isso irá desativar o HRP.
16. Aspirar os poços e lavar pelo menos 5 vezes com 300 μ L / poço de lavagem. Permitir que um "molho" de tempo (30-60 segundos) para cada etapa de lavagem. Inverta a placa em papel absorvente para remover qualquer tampão residual.

17. Adicionar 100 uL / poço de solução de substrato TMB a cada poço. Incubar placa à temperatura ambiente durante 15 minutos.

Nota: Levar a solução de substrato TMB para a temperatura ambiente antes de usar.

18. Adicionar 50 mL de solução de parada em cada poço.

19. Leia placa em 450 nm dentro de 30 minutos de adição da solução stop. Se comprimento de onda subtração está disponível, subtrair os valores de 570 nm dos de 450 nm e análise de dados.

APÊNDICE 3: Procedimento para determinação dos níveis de FGF no sobrenadante da cultura de células de MM utilizando o Kit RayBio®

Preparação do reagente

1. Trazer todos os reagentes e amostras à temperatura ambiente (18 - 25 °C) antes usar.
2. Diluição da amostra: as amostras devem ser diluídas com o Diluente B (ponto E) que é destinado à diluição de sobrenadantes de cultura e urina.
3. Ensaio B Diluente deve ser diluído 5 vezes com água deionizada ou destilada água.
4. Preparação do padrão: o conteúdo do frasco de C é adicionado a 1x Diluente do ensaio B (por meio de cultura de células e urina) usado para preparar uma solução padrão de 100ng / ml. Dissolver o pó completamente por uma mistura suave. Adicionar 100 ul padrão bFGF do frasco C, em um tubo com 900 ul Diluente de Ensaio B Diluente de Ensaio 1x para preparar um estoque 10.000 pg / ml de solução padrão. Pipetar 300 ul Diluente do ensaio B em cada tubo. Utilizar a solução padrão de reserva para produzir uma diluição em série. Misturar cuidadosamente cada tubo, antes da transferência seguinte. O diluente de ensaio B serve como padrão zero (0 pg / ml).
5. Caso o Concentrado de Lavagem (20x) contenha cristais visíveis, esquentar à temperatura ambiente e misturar suavemente até à dissolução. Diluir 20 ml de Tampão de Lavagem concentrado em água deionizada ou destilada para produzir 400 ml de 1x tampão de lavagem.
6. Resumidamente girar o frasco anticorpo de detecção (Item F) antes do uso. Adicionar 100 ul de 1x B Diluente de Ensaio para dentro do frasco para preparar um anticorpo de detecção concentrado. Pipetar cima e para baixo para misturar suavemente (o concentrado pode ser armazenada a 4 °C durante 5 dias). O concentrado de anticorpo de detecção deve ser diluído 65 vezes com 1x Assay Diluente B e utilizado no passo 4 da parte VI Ensaio de procedimento.
7. Resumidamente girar o frasco concentrado HRP-estreptavidina (G Item) e pipeta para cima e para baixo para misturar suavemente antes da utilização. HRP-Estreptavidina concentrado deve ser diluída 6.000 vezes com Diluente de Ensaio 1x B.

Procedimento

1. Trazer todos os reagentes e amostras à temperatura ambiente (18 - 25 °C) antes usar. Recomenda-se que todos os padrões e as amostras ser executado pelo menos em duplicata.
2. Adicionar 100 uL de cada padrão e amostra nos poços apropriados. Cobrir os poços e incubar durante 2,5 horas a temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C com agitação suave. Rejeitar a solução e lavar 4 vezes com solução de lavagem 1x. Lave por enchimento cada poço com tampão de lavagem (300 uL). A remoção completa de líquido em cada passo é essencial para um bom desempenho. Após a última lavagem, remover qualquer restante tampão de

lavagem por aspiração ou decantação. Inverter a placa contra as toalhas de papel limpo.

4. Adicionar 100 μ l de anticorpo preparado biotilado (Preparação do Reagente passo 6) a cada poço. Incubar durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação suave.

5. Descartar a solução. Repita a lavagem como no passo 3.

6. Adicione 100 μ l de solução de estreptavidina preparada (ver Preparação dos Reagentes passo 7) a cada poço. Incubar durante 45 minutos à temperatura ambiente com agitação suave.

7. Descartar a solução. Repita a lavagem como no passo 3. 8. Adicionar 100 μ l de TMB Um passo-reagente substrato (ponto H) a cada poço. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente no escuro com suave agitação

9. Adicionar 50 μ l de solução de paragem (Item I) a cada poço. Leitura em 450 nm imediatamente.

Cálculo dos resultados

Calcular a absorbância média para cada conjunto de padrões duplicados, controles e amostras, e subtrair a média de densidade óptica padrão zero. Traçar a curva padrão em papel log-log gráfico ou usando um software gráfico Sigma, com concentração padrão sobre o eixo x e a absorbância no eixo y. Desenhe o melhor ajuste de linha reta através dos pontos normais.

APÊNDICE 4: Procedimento para determinação dos níveis de VEGF no sobrenadante da cultura de células de MM utilizando o Kit RayBio®

Preparação do reagente

1. Trazer todos os reagentes e amostras à temperatura ambiente (18 - 25 °C) antes usar.
 2. Diluição da amostra: Se as amostras devem ser diluídas com diluente de Ensaio B que é utilizado para a diluição dos sobrenadantes de cultura e urina.
 3. Diluente de ensaio B deve ser diluído 5 vezes com água desionizada ou destilada.
- RayBio® Human VEGF R2 ELISA Kit protocolo nº 4
4. Preparação do padrão: adicionar ao conteúdo do frasco de C a 1x o Diluente B para meio de cultura de células e urina para preparar uma 100 ng / ml padrão. Dissolver o pó completamente por uma mistura suave. Adicionar 150 ul padrão R2 de VEGF tubo em um tubo com 1x de diluente de ensaio para preparar uma solução padrão de 25.000 pg / ml. Pipetar 1x o diluente de ensaio B em cada tubo. Utilizar a solução padrão de reserva para produzir uma diluição série. Misturar cuidadosamente cada tubo, antes da próxima transferência. O diluente de ensaio B serve como o zero padrão (0 pg / ml).
 5. Se o Concentrado de Lavagem (20x) contém cristais visíveis, esquentar à temperatura ambiente e misturar suavemente até à dissolução. Diluir 20 ml de Tampão de Lavagem concentrado em água deionizada ou destilada para produzir 400 ml de 1x tampão de lavagem.
 6. Adicionar 100 ul de 1x B Diluente de Ensaio para dentro do frasco do anticorpo de detecção. Pipetar cima e para baixo para misturar suavemente (o concentrado pode ser armazenada a 4 °C durante 5 dias). O anticorpo de detecção deve ser diluído 80 vezes com 1x Assay Diluente B .
 7. Resumidamente agitar o frasco concentrado HRP-estreptavidina antes do uso. O HRP-Estreptavidina concentrado deve ser diluído 30.000 vezes com 1x Ensaio Diluente B. Adicionar 2 uL de HRP-Estreptavidina concentrado em um tubo com 198,0 B Diluente de Ensaio 1x uL para preparar uma HRPStreptavidin 100 vezes diluído solução (não armazenar a solução diluída para o dia seguinte usar). Misturar completamente e, em seguida, 50 ul de pipetar preparada de 100 vezes solução diluída para um tubo com 15 ml de B Diluente de Ensaio 1x para preparar uma dobra 30.000 final diluída HRP-Estreptavidina solução.

Procedimento

1. Trazer todos os reagentes e amostras à temperatura ambiente (18 - 25 °C) antes usar. Recomenda-se que todos os padrões e as amostras ser executado pelo menos em duplicata.
2. Adicionar 100 uL de cada padrão (ver passo Reagente Preparação 2) e amostra nos poços apropriados. Cubra poço e incubar durante 2,5 horas a temperatura ambiente ou durante a noite a 4 ° C com agitação suave.
3. Rejeitar a solução e lavar 4 vezes com solução de lavagem 1x. Lave por de enchimento cada poço com tampão de lavagem (300 uL), utilizando uma pipeta multi-canal ou lavadora automática. A remoção completa de líquido em cada passo é essencial para um bom desempenho. Após a última lavagem, remover qualquer resíduo de tampão de lavagem por aspiração ou decantação. Inverter a placa contra as toalhas de papel limpo.
4. Adicionar 100 ul de anticorpo 1x preparada biotilado (Preparação do Reagente passo 6) a cada poço. Incubar durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação suave.
5. Descartar a solução. Repita a lavagem como no passo 3.
6. Adicione 100 ml de solução de estreptavidina preparada (ver Preparação dos Reagentes passo 7) a cada poço. Incubar durante 45 minutos à temperatura ambiente com agitação suave.
7. Descartar a solução. Repita a lavagem como no passo 3.
8. Adicionar 100 ul de TMB Um passo-reagente substrato (ponto H) a cada poço. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente no escuro com suave agitação.
9. Adicionar 50 ul de solução de paragem (Item I) a cada poço. Leitura em 450 nm imediatamente.

Cálculo dos resultados

Calcular a absorbância média para cada conjunto de padrões duplicados, controles e amostras, e subtrair a média de densidade óptica padrão zero. Traçar a curva padrão em papel log-log gráfico ou usando um software gráfico Sigma, com concentração padrão sobre o eixo x e a absorvância no eixo y.