

A rapamicina protege as células mielomatosas da apoptose induzida pelo TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)

Patrícia Leonor Canas Guimarães

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor José Eduardo Guimarães pela orientação e revisão final da tese.

Agradeço ao Professor Doutor Jesus San Miguel e ao Doutor Atanasio Pandiella pela orientação e pela disponibilização de meios logísticos.

Finalmente, agradeço ao investigador Jean-Marie Ramírez pela colaboração na execução das experiências.

UNIVERSIDADE DO PORTO
Faculdade de Medicina

**A rapamicina protege as células mielomatosas
da apoptose induzida pelo TRAIL (*TNF-related
apoptosis-inducing ligand*)**

Mestrado de Medicina e Oncologia Molecular
Dezembro, 2007

Patrícia Leonor Canas Guimarães

Orientador: Professor Doutor José Eduardo Guimarães

Os estudos apresentados nesta tese foram realizados nos Laboratórios 12 e 15 do Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca - Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	IX
INTRODUÇÃO	1
• DEFINIÇÃO	3
• AVANÇOS NA ABORDAGEM TERAPÊUTICA	3
• BIOLOGIA DO MIELOMA MÚLTIPLO	8
• SINALIZAÇÃO DO CRESCIMENTO	8
~ IL-6 (interleucina-6)	8
~ IGF-1 (<i>insulin-like growth factor-1</i>)	11
~ VEGF (<i>vascular endothelial growth factor</i>)	12
~ TNF-α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)	13
~ SDF-1α (<i>stromal cell-derived factor-1 α</i>)	13
• VIA DE SINALIZAÇÃO DO NF-kB (nuclear factor kB)	13
• PATOGÊNESE DA DOENÇA OSTEOLÍTICA	17
• INDEPENDÊNCIA DO MICROAMBIENTE MEDULAR	17
• SINALIZAÇÃO VIA mTOR (<i>mammalian target of rapamycin</i>)	19
~ Vias proximais a mTOR	19
~ Vias distais a mTOR	20
• MECANISMOS DE ACÇÃO DA RAPAMICINA	22
• ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DA RAPAMICINA	24
• APOPTOSE VIA RECEPTORES DE MORTE	25
~ Amplificação da apoptose pela via mitocondrial	29
• OBJECTIVOS	32
MATERIAL E MÉTODOS	35
• REAGENTES E IMUNOQUÍMICOS	37
• CULTURAS CELULARES	37
• ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO, CICLO CELULAR E APOPTOSE	38
~ Ensaio de MTT	38
~ Coloração com anexina V/iodeto de propídio	39
~ Coloração do DNA com iodeto de propídio	40

• SDS-PAGE E <i>WESTERN BLOTTING</i>	41
• PRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS BIO-TRAIL-DISC	42
• ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DO TRAIL POR CITOMETRIA DE FLUXO	43
RESULTADOS	45
~ A rapamicina inibiu o crescimento de linhas celulares de mieloma múltiplo	47
~ A rapamicina induziu paragem do ciclo celular na fase G0/G1, mas não causou apoptose significativa das células mielomatosas	48
~ O TRAIL induziu apoptose de linhas celulares de mieloma múltiplo	50
~ A rapamicina protegeu as células mielomatosas da apoptose induzida pelo TRAIL, quando usada em tratamento simultâneo e prévio	51
~ A rapamicina não protegeu as células mielomatosas da apoptose induzida pelo MegaFasL	60
~ A rapamicina não afectou a expressão de mediadores da apoptose nas células mielomatosas	62
~ A rapamicina não afectou o recrutamento do FADD (<i>Fas-associated death domain</i>) e da pró-caspase 8 para o DISC (<i>death-inducing signaling complex</i>) induzido pela ligação do TRAIL aos seus receptores de morte, e tão-pouco diminuiu a clivagem da pró-caspase 8 ao nível do DISC	64
~ A rapamicina diminuiu a expressão dos receptores DR4 (<i>death receptor 4</i>) e DR5 à superfície das células mielomatosas, mas não a nível intracelular	65
DISCUSSÃO	71
RESUMO	85
• RESUMO EM PORTUGUÊS	87
• ENGLISH SUMMARY	89
<i>CURRICULUM VITAE</i>	91
REFERÊNCIAS	95

ABREVIATURAS

AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
Akt/PKB	<i>protein kinase B</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
Apaf-1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
APC	aloficocianina
Bio-TRAIL	TRAIL biotinilado
BIR	<i>baculovirus IAP [inhibitor of apoptosis protein] repeat</i>
BTD	bortezomib, talidomida e dexametasona
BSA	albumina sérica bovina
CAMA-1	linha celular de carcinoma da mama humano
CARD	<i>caspase-recruitment domain</i>
CC-5013	lenalidomida; Revlimid®
CCI-779	<i>Sirolimus</i> , análogo da rapamicina
CDK	<i>cyclin-dependent kinases</i>
Células T Jurkat	linha celular de linfoma T humano
CEM	células do estroma medular
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CM	células mielomatosas
CPH	células progenitoras hematopoiéticas
DcR1	<i>decoy receptor 1</i>
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
Dex	dexametasona
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DR4	<i>death receptor 4</i>
4E-BP's	<i>eIF4E binding proteins</i>
eIF's	<i>eukaryotic initiating factors</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>

Fas-L	Fas-ligando
FKHR	<i>forkhead transcription factor</i>
FLIP	<i>FLICE-inhibitory protein</i>
GSK-3	<i>Glycogen synthase kinase-3</i>
HCT116	linha celular de carcinoma do cólon humano
HeLa	linha celular de carcinoma cervical humano
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>
IETD-FMK	inibidor específico da caspase 8
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IL-6	interleucina-6
IL-1β	interleucina-1 beta
IκB	<i>NF-κB inhibitor</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IMiDs	<i>Immunomodulatory derivatives</i>
IP	iodeto de propídio
IRES	<i>internal ribosome entry sites</i>
IRS-1	<i>insulin receptor substrate-1</i>
JAK	<i>jun-activated kinase</i>
LEHD-FMK	inibidor específico da caspase 9
LFA-1	<i>leukocyte-function-associated antigen 1</i>
LKB1/STK11	<i>serine/threonine kinase 11</i>
LY294002	inibidor da PI-3K
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBRP	muito boa resposta parcial
Mcl-1	<i>myeloid cell factor-1</i>
MegaFasL	MegaFasLigando
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MIP-1α	<i>macrophage inflammatory protein 1α</i>
MM	mieloma múltiplo
MO	medula óssea

mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-kappaB</i>
NOD/SCID	<i>non-obese diabete/severe combined immunodeficient</i>
NP	neuropatia periférica
OPG	osteoprotegerina
PAD	PS-341/bortezomib, adriamicina/doxorubicina e dexametasona
PARP	<i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PI-3K	<i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>
PKCα	<i>protein kinase Cα</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10</i>
PVDC	<i>polyvinylidene difluoride</i>
Q$_t$	quimioterapia intensiva
RAFTK	<i>related adhesion focal tyrosine kinase</i>
RANK	<i>receptor activator of NF-κB</i>
RANK-L	<i>RANK-ligand</i>
Raptor	<i>regulatory-associated protein of TOR</i>
Rb	retinoblastoma
RC	resposta completa
Rel	Reticuloendoteliase
Rev-Dex	Revlimid® e dexametasona
RHD	<i>Rel homology domain</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
Rictor	<i>rapamycin insensitive component of TOR</i>
RIP	<i>receptor-interacting protein</i>
RNAm 5'-TOP	RNA m com sequência oligopirimidínica 5' terminal
SDF-1α	<i>stromal cell-derived factor-1 α</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>

SDS-PAGE	electroforese em gel de SDS-poliacrilamida
SG	sobrevivência global
SHP2	<i>SH2 domain containing protein</i>
S6K's	<i>ribosomal protein S6 kinases</i>
SLE	sobrevivência livre de eventos
SLP	sobrevivência livre de progressão
SP	sangue periférico
TSC1/TSC2	<i>tuberous sclerosis complex 1 (hamartin) and 2 (tuberin)</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
Smac/Diablo	<i>second mitochondria-derived activator of caspase/direct-IAP binding protein with low pI</i>
SN50	inibidor da translocação nuclear do NF-kB e da sua função ativadora da transcrição
Tal-Dex	talidomida e dexametasona
TD	talidomida e dexametasona
TE	tromboembólicas
TEV	tromboembolismo venoso
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
TNFR	<i>TNF receptor</i>
TRADD	<i>TNFR- associated death domain protein</i>
TRAF-2	<i>TNFR-associated factor 2</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
VAD	vincristina, adriamicina/doxorubicina e dexametasona
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLA-4	<i>very late antigen 4</i>
VTD	Velcade®, talidomida e dexametasona
VTD-PACE	Velcade®, talidomida, dexametasona, cisplatino, adriamicina/doxorubicina, ciclofosfamida e etoposídeo
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

INTRODUÇÃO

DEFINIÇÃO

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia de células B disseminada, caracterizada pela acumulação de plasmócitos malignos na medula óssea (MO), geralmente produtores de um excesso de paraproteína monoclonal, que pode ser uma imunoglobulina ou uma das cadeias leves (κ ou λ) das imunoglobulinas.¹

Foi postulada uma origem nos plasmablastos circulantes, pós-centro germinal, que se estabelecem na medula óssea, onde sofrem diferenciação em plasmócitos maduros.¹

O MM representa 1% de todas as neoplasias malignas e 10% das neoplasias hematológicas, sendo a segunda mais frequente. A idade mediana ao diagnóstico é de 65 anos. Afecta mais frequentemente homens. A incidência é maior em negros que em brancos.¹

O quadro clínico resulta dos efeitos directos da massa tumoral, da libertação de citocinas pelas células tumorais e estromais medulares e da deposição da paraproteína anormal.¹ Entre os sintomas e sinais que caracterizam o quadro clínico, destacam-se a hiperproteinemia, a anemia, a destruição óssea, as infecções recorrentes, a hipercalcemia, a insuficiência renal e as alterações da coagulação.²

AVANÇOS NA ABORDAGEM TERAPÊUTICA

Durante muitos anos, a combinação de melfalam e prednisolona foi o tratamento *standard* do MM, apresentando taxas de resposta de aproximadamente 50% e sobrevivência mediana de cerca de 3 anos. Com o objectivo de melhorar o *outcome* destes doentes a dose de quimioterapia foi escalada, tornando necessário o resgate com células progenitoras hematopoiéticas (CPH). Em ensaios clínicos randomizados, como o *Medical Research Council Myeloma VII*,³ a quimioterapia em alta dose seguida de transplante autólogo de CPH aumentou a taxa de respostas completas (RC: 44% vs 8%), e prolongou a sobrevivência livre de progressão (SLP mediana: 32 vs 20 meses) e a

sobrevivência global (SG mediana: 54 vs 42 meses), quando comparada com o tratamento *standard*. Com base na existência de um efeito dose-resposta *in vivo* para o melfalam, a intensificação adicional da dose citotóxica foi explorada através da realização de transplante autólogo *tandem* (duplo). No ensaio clínico *Intergroup Francophone du Myélome 94* foi demonstrado, pela primeira vez, que o transplante *tandem* aumentou a sobrevivência livre de eventos (SLE mediana: 30 vs 25 meses), SLP (mediana: 36 vs 29 meses) e a SG (mediana: 58 vs 48 meses), quando comparado com um transplante único realizado após o mesmo tratamento de indução (VAD).⁴ Aos 7 anos de seguimento, o benefício do transplante *tandem* manteve-se somente para os doentes que não atingiram pelo menos uma muito boa resposta parcial (MBRP: redução $\geq 90\%$ dos níveis plasmáticos de paraproteína) após o primeiro transplante (SG aos 7 anos de 43% vs 11%). O estudo *Bologna 96* que, à semelhança do anterior, incluiu doentes com idade inferior a 60 anos, induzidos com quimioterapia de combinação VAD, comprovou existirem prolongamentos da SLE (mediana: 35 vs 23 meses) e da SLP (mediana: 42 vs 24 meses) para os doentes que receberam transplante autólogo *tandem* em comparação com os que receberam um único transplante, vantagem que foi atribuída a uma maior redução da massa tumoral, conforme traduzido pela maior taxa de respostas completas e quase completas (47% vs 33%).⁵ Contrariamente, não houve diferenças significativas na SG mediana (71 vs 65 meses) e na SG aos 7 anos de seguimento (43% vs 46%). A realização de um segundo transplante e a utilização de novos agentes terapêuticos (talidomida e bortezomib) no tratamento das recaídas provavelmente contribuiu para o prolongamento da sobrevivência dos doentes randomizados para receber transplante único.

Para facilitar a mobilização de CPH passou a evitar-se o uso de agentes alquilantes e o VAD (vincristina, doxorubicina e dexametasona) tornou-se o regime de indução preferido, com taxas de resposta de 55-65% quando usado como terapêutica de primeira linha.² Não obstante, o regime VAD apresenta várias desvantagens, em particular a necessidade dum catéter venoso central para a administração de vincristina e doxorubicina em perfusão contínua, que predispõe a septicemia e trombose associada a catéter. Por outro lado, a maioria da actividade do VAD foi atribuída aos pulsos de dexametasona do regime, o que fez com que o tratamento de indução com altas doses

intermitentes de dexametasona se popularizasse. A combinação de talidomida e dexametasona (Tal-Dex) surgiu como alternativa ao VAD, após ter sido comprovada a eficácia da talidomida isolada e combinada com a dexametasona no tratamento de doentes com MM em recaída e refractário. As taxas de resposta ao regime Tal-Dex (talidomida 200 mg/dia, dias 1-28; dexametasona 40 mg/dia, dias 1-4, 9-12 e 17-20) situaram-se entre 65-70%,² e foram significativamente superiores às obtidas com dexametasona em alta dose intermitente (63% vs 41%),⁶ e similares ou superiores às obtidas com VAD⁷. Cavo e colaboradores,⁸ num estudo retrospectivo caso-controlo emparelhado, ao compararem doentes com MM primariamente tratados com o regime Tal-Dex ou o VAD durante 4 meses, demonstraram que a taxa de respostas (76% vs 52%) e a redução da massa tumoral, traduzida pela diferença entre os níveis de imunoglobulinas monoclonais antes e após o tratamento, foram superiores com o Tal-Dex. A taxa de mortalidade atribuível ao tratamento Tal-Dex não foi superior à observada com dexametasona em alta dose intermitente e com o regime VAD.⁶⁻⁸ Não obstante, a toxicidade do tratamento primário do MM com Tal-Dex foi considerável, sendo o tromboembolismo venoso (TEV) a complicação grave mais frequente, atingindo 20% dos doentes.⁶ A neuropatia periférica (NP) grave, grau ≥ 3 segundo os critérios do *National Cancer Institute* (NCI), teve uma incidência similar (<10%) nos doentes tratados com Tal-Dex e com VAD.^{6,8} No momento actual, a escolha do tratamento primário do MM não é consensual, impondo-se a necessidade de ponderar entre a maior taxa de respostas alcançadas com a combinação Tal-Dex à custa duma elevada frequência de complicações tromboembólicas (TE), e a possibilidade de administrar ciclos VAD em infusão rápida (30 minutos), o que permite eliminar as complicações associadas a catéter venoso central e, ao mesmo tempo, manter uma taxa de respostas semelhante à alcançada com a perfusão contínua de vincristina e doxorubicina.⁹

Recentemente, um análogo da talidomida, a lenalidomida (CC-5013), mostrou actividade anti-mieloma pré-clínica significativamente mais potente que a talidomida, e resultados promissores quando usada isoladamente e em combinação com a dexametasona no tratamento de doentes com MM recaído e refractário. Num ensaio clínico fase II que incluiu 34 doentes com MM diagnosticado de novo, a combinação da lenalidomida (25 mg/dia, dias 1-21) com dexametasona (40 mg/dia, dias 1-4, 9-12 e 17-20) resultou numa

taxa de respostas de 91%, com 38% dos doentes a atingirem uma resposta completa ou quase completa.¹⁰ A neuropatia periférica foi menos frequente (21%) e de menor gravidade (grau ≤ 2 segundo os critérios do NCI) do que a condicionada pela talidomida. A incidência de TEV, na ausência de profilaxia anti-trombótica, foi considerável.

No ensaio clínico IFM99 02, Attal e colaboradores¹¹ demonstraram que a manutenção com talidomida (400 mg/dia) após transplante autólogo duplo aumentou a taxa de RC e MBRP (67% vs 57%), a SLE aos 3 anos (52% vs 37%) e a SG aos 4 anos (87% vs 74%), sem aumentar significativamente as complicações TE em relação ao grupo controlo (4% vs 1%), na ausência de profilaxia. Doses mais baixas de talidomida (50-100 mg/dia) seriam igualmente eficazes e condicionariam uma menor incidência de efeitos laterais, em particular a NP, que foi grave em 7% dos doentes. Como a qualidade da resposta após realização de transplante autólogo parece influenciar a sobrevivência, os doentes que beneficiariam de manutenção com talidomida em baixa dose seriam os que não apresentassem del(13)/(13q) ao diagnóstico e os que não atingissem pelo menos uma MBRP após transplantação. Do mesmo modo, a suspensão da talidomida quando fosse atingida uma MBRP evitaria o desenvolvimento de resistência ao fármaco, que manteria a sua eficácia no tratamento de recaídas posteriores.

Barlogie e colaboradores,¹² avaliaram a eficácia e a incidência de complicações da combinação da talidomida com a terapia total 2 (TT2), que prevê a realização de transplante autólogo *tandem* em doentes com idades até 75 anos. Quando comparados com o grupo controlo, que recebeu unicamente quimioterapia intensiva (Qt_i), os doentes tratados com talidomida e Qt_i tiveram taxas de RC mais elevadas (62% vs 43%) e SLE mais longas (56% vs 44%), embora os autores não encontrassem diferença na SG, em parte porque após recaída o grupo controlo teve uma maior taxa de respostas à quimioterapia *salvage* (71% vs 55%) e uma SG mais longa (1,1 vs 2,7 anos). Concluem que reservar a talidomida para manutenção com baixas doses após transplante *tandem* tem a dupla vantagem de evitar o desenvolvimento de resistências e reduzir significativamente a incidência de efeitos laterais importantes, em particular o TEV e NP.

Embora não consensual, a obtenção de respostas de qualidade (RC, MBRP) com a

quimioterapia em alta dose e transplante autólogo prolongou a sobrevivência em muitos ensaios clínicos,^{3-5,11-13} pelo que se tornou um objectivo primordial. Para além da manutenção, a melhoria da eficácia do tratamento de indução pode aumentar as taxas de RC e MBRP após transplante. Com os regimes VAD e similares, Tal-Dex e Rev-Dex (Revlimid® e dexametasona) as taxas de RC pós-indução foram, em geral, inferiores a 10%. Em três ensaios clínicos fase II,¹⁴⁻¹⁶ que estudaram a resposta ao tratamento de indução com combinações algo variáveis de bortezomib e dexametasona num número limitado de doentes (32-48), as taxas de resposta situaram-se entre 65% e 88%, com 12,5% a 25% de RC. No estudo PETHEMA,¹⁶ que obteve 12,5% de RC, o critério de imunofixação negativa esteve incluído na definição de RC. A resposta ao tratamento não diferiu quando estavam presentes alterações citogenéticas de mau prognóstico: del(13)/(13q), translocações envolvendo IgH e del(17p).^{15,16} Os grupos francês¹⁵ e espanhol¹⁶ avaliaram as taxas de resposta três meses após transplante autólogo, que foram 91% e 88%, respectivamente, com 33% de RC em ambos os estudos. A frequência e a gravidade dos efeitos laterais variaram com o número de ciclos de bortezomib e a dose total de dexametasona administrados.¹⁴⁻¹⁶ A NP esteve presente em cerca de 30% dos doentes, e a percentagem de casos graves aumentou com o número de ciclos de bortezomib de 0% com três ciclos, para 6% com quatro e 16% com seis. A toxicidade hematológica (neutropenia e trombocitopenia) também foi muito variável. Não houve complicações TE em nenhum dos estudos.

Após ser demonstrada a existência de efeitos sinérgicos *in vitro* entre o bortezomib e outros fármacos em uso clínico, nomeadamente a doxorubicina, o melfalam e a talidomida, foram concebidas combinações triplas entre o bortezomib, a dexametasona e um terceiro fármaco, na esperança de obter um aumento adicional na qualidade das respostas ao tratamento de indução que, previsivelmente, aumentaria o número de doentes a alcançarem RC e MBRP após o primeiro transplante autólogo, dispensando a realização do segundo transplante e, deste modo, reduzindo a toxicidade do tratamento.

As melhores respostas verificaram-se com dois esquemas de indução triplos, o PAD (PS-341/bortezomib, doxorubicina e dexametasona)¹⁷ e o BTD (bortezomib, talidomida e dexametasona)¹⁸, ambos seguidos de transplante autólogo único, e com a terapia total 3

(TT3)¹⁹, na qual dois ciclos de VTD-PACE (Velcade®, talidomida, dexametasona, cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamida e etoposídeo) foram administrados antes e depois de transplante autólogo *tandem*, seguidos de manutenção durante três anos, com ciclos mensais VTD no primeiro ano, e ciclos TD no segundo e terceiro. Após transplante, as taxas de respostas foram 95% com os regimes PAD e BTM, e 89% com a TT3, e as taxas de RC (imunofixação negativa) foram 43%, 37% e 52%, respectivamente. A mortalidade relacionada com o tratamento foi 5% para a TT3, 3% para o esquema BTM e nula para o PAD. Os efeitos laterais graves foram mais frequentes com estes esquemas terapêuticos, em particular com a TT3 que apresentou 13% de casos de NP grave no final da manutenção, e 27% de complicações TE, não obstante a profilaxia com heparina de baixo peso molecular.¹⁹ No tratamento com PAD a NP grave afectou 10% dos doentes, pelo que a combinação com doxorubicina não parece ter agravado a neurotoxicidade do bortezomib.¹⁷ A maioria dos doentes (84%) tratados com o regime BTM só necessitaram de 1-2 ciclos até atingirem a remissão, o que minimizou a toxicidade, em particular a NP grave, que atingiu 5% dos doentes.¹⁸ Os doentes tratados com BTM foram hipocoagulados, o que explica a baixa incidência (5%) complicações TE.

BIOLOGIA DO MIELOMA MÚLTIPLO

A adesão das células mielomatosas (CM) às proteínas da matriz extracelular e às células do estroma medular (CEM), que induz a transcrição e secreção de citocinas (IL-6, IGF-1, TNF- α , VEGF, SDF-1), a exposição a essas citocinas e a angiogénese no microambiente medular são fundamentais na patogénese do MM, pois conferem vantagem proliferativa, protegem da apoptose e causam resistência a fármacos.²⁰⁻²²

SINALIZAÇÃO DO CRESCIMENTO

IL-6 (interleucina-6)

A IL-6 é primariamente produzida pelas CEM e tem acção parácrina sobre as CM, induzindo a sua sobrevivência e crescimento.²⁰⁻²³ A sua secreção é estimulada pela adesão

das CM às CEM e por citocinas (TNF α , VEGF, IL-1 β , SDF-1). A interação com as CM causa activação do NF-kB (*nuclear factor-kappaB*) da CEM, com consequente aumento da transcrição e secreção de IL-6.

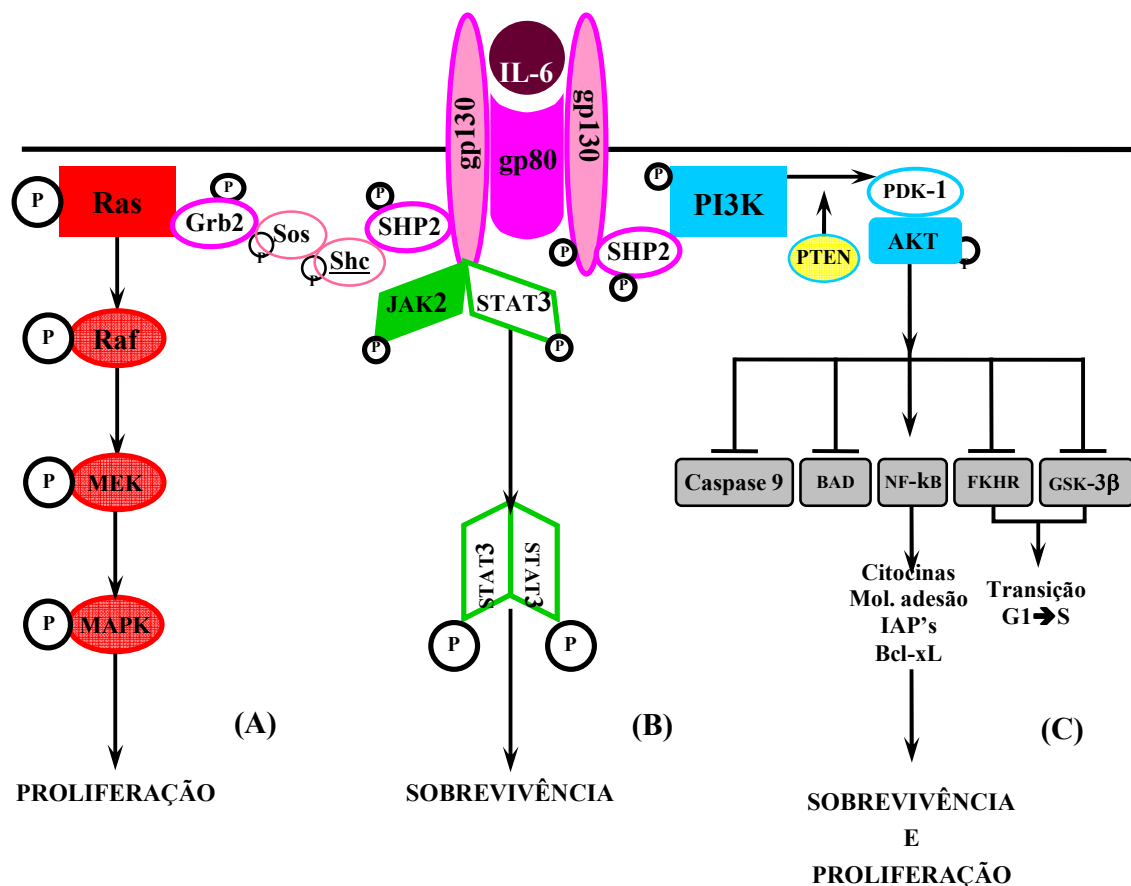


Figura 1 – A ligação da interleucina-6 (IL-6) ao seu receptor à superfície celular activa três vias de transdução do sinal, que estão implicadas no crescimento e sobrevivência das células mielomatosas. (A) Via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). (B) A via JAK/STAT3 (*jun-activated kinase/signal transducer and activator of transcription 3*). (C) Via PI-3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*)/Akt.

A IL-6 liga-se à CM através da gp80 (IL-6R; CD80), induz a fosforilação e a homodimerização da gp130, com consequente activação das vias de sinalização intracelular a jusante: Ras/Raf/MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*)/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), JAK (*jun-activated kinase*)/STAT3 (*signal*

transducer and activator of transcription 3) e PI-3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*)/Akt (PKB: *protein kinase B*).²²

A sobrevivência e resistência a fármacos das CM é mediada através da activação das vias JAK/STAT3 e PI3-K/Akt.²⁰⁻²⁴ O factor de transcrição STAT3 regula a expressão de Mcl-1 e Bcl-xL, moléculas anti-apoptóticas da família Bcl-2. A activação da via PI3-K/Akt das CM pela IL-6 induz proliferação, protege da apoptose e tem efeitos reguladores do ciclo celular. A fosforilação da PI3-K é mediada pelo SHP2 (*SH2 domain containing protein*) activado ao interagir com gp130.^{23,24} A Akt, uma proteína serina (Ser)/treonina (Thr) cinase, e as suas moléculas alvos a jusante (caspase 9, Bad, NF-κB, FKHR, GSK-3β) são fosforiladas após ocorrer activação da PI-3K.

A família de factores de transcrição FKH (*Forkhead*) inclui três membros conhecidos, FKHR, FKHL1 e AFX. Os factores de transcrição FKH têm função pró-apoptótica, por aumentarem a transcrição dos genes do Fas-L (Fas-ligando) e do Bim, e função reguladora do ciclo celular, por aumentarem a transcrição do p27^{KIP1}, que inibe a CDK (*cyclin-dependent kinase*).^{24,25} A inactivação dos factores FKH por fosforilação pela Akt, leva a diminuição da expressão de p27^{KIP1} e, conseqüentemente, à transição da fase G1 para a S do ciclo celular.

A função da GSK-3 (*Glycogen synthase kinase-3*) é inibida por fosforilação pela Akt. Desta forma, a GSK-3 não inactiva a β-catenina por fosforilação, que sofre translocação para o núcleo onde induz a transcrição da ciclina D1. A fosforilação da GSK-3 também impede que esta fosforile a ciclina D1, marcando-a para ubiquitinação e degradação pelo proteosoma.²⁶ A ciclina D1 presente no núcleo na fase G1, forma complexos ciclina D1-CDK4/6 (*cyclin-dependent kinases 4 and 6*) que fosforilam a proteína supressora RB (Retinoblastoma) e precipitam a transição da fase G1 para a S do ciclo celular.

A sinalização pela via Ras/Raf/MEK/MAPK leva a proliferação das CM. Hideshima e colaboradores²⁴ verificaram que a inibição da PI3-K em CM expostas a IL-6, condicionou uma diminuição da proliferação celular e da activação da MEK e da MAPK induzidas pela IL-6, sugerindo a existência dum canal de comunicação entre as duas vias

de sinalização. Portanto, parte do efeito proliferativo induzido pela IL-6 em CM parece ser mediada pela via PI3-K/Akt.^{24,27}

A dexametasona (Dex) induz apoptose das CM através da estimulação da libertação de Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*) pela mitocôndria, que desloca o XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) do seu local de ligação à caspase 9, permitindo que ocorra activação da via mitocondrial da apoptose.²²⁻²⁴ A IL-6 protege as CM da apoptose induzida por Dex através da activação da via PI3K/Akt, pois a caspase 9 e o Bad (proteína da família Bcl-2) são inactivados por fosforilação pela Akt. Por outro lado, a Dex desencadeia apoptose das CM através da activação do RAFTK (*related adhesion focal tyrosine kinase*), que se localiza a montante das caspases. O SHP2, cuja activação é induzida por IL-6, desfosforila o RAFTK, inactivando-o.

A IL-6 estimula a sua própria secreção e a de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) pelas CM, inibe a diferenciação dos monócitos em células dendríticas e a função apresentadora de antigénios das células dendríticas, desse modo contribuindo para a imunodepressão característica do MM.^{20,21}

IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*)

Como é segregado pelas CEM e CM, o IGF-1 actua de forma parácrina e autócrina sobre as CM e, ao interagir com o seu receptor IGF-1R, promove a proliferação, sobrevivência e resistência a fármacos, através da activação das vias Ras/Raf/MEK/MAPK e PI-3K/Akt.²⁰⁻²³

O IGF-1 é um indutor mais potente da sinalização via PI-3K/Akt do que a IL-6, e também protege da apoptose por dexametasona.²²

A sinalização através de IGF-1/PI-3K/Akt inibe a apoptose das CM, porque a indução da Akt conduz a inactivação das proteínas pró-apoptóticas FKHR (*forkhead transcription factor*), Bad e caspase 9, e a activação do IKK (*I κ B kinase*) que, ao fosforilar o I κ B (*NF- κ B inhibitor*), liberta o NF- κ B da sua inibição.^{20-24,27} O NF- κ B sofre translocação para o

núcleo onde activa a transcrição de genes que promovem a sobrevivência celular: (a) citocinas, como a IL-6; (b) moléculas de adesão entre as CM e as proteínas da matriz extracelular e as CEM, como o VLA-4 (*very late antigen 4*) e o seu ligando VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*); (c) proteínas anti-apoptóticas, como o FLIP (*FLICE-inhibitory protein*), o cIAP2 (*cellular inhibitor of apoptosis protein 2*), o XIAP e a survivina.^{22,28}

O IGF-1 aumenta a actividade da telomerase por induzir a sinalização pela via PI-3K/Akt/NF-kB.^{21,22} A proliferação sustentada e a estabilidade cromossómica das células tumorais carece da telomerase, uma DNA polimerase que alonga os telómeros dos cromossomas, compensando as perdas ocorridas em cada ciclo de replicação do DNA.²⁹ Nas CM, a actividade da telomerase é regulada por vários mecanismos: (a) regulação transcricional da subunidade catalítica hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) pelo NF-kB, entre outros factores transcricionais capazes de se ligar ao seu promotor génico; (b) translocação da proteína hTERT do citoplasma para o núcleo, após sofrer fosforilação pela Akt, seguida de ligação ao NF-kB fosforilado.

VEGF (*vascular endothelial growth factor*)

O VEGF é produzido tanto pelas CEM como pelas CM.²² A adesão das CM às CEM, a acção da IL-6, e a activação das CM e CEM pelo ligando do CD40 são estímulos para a secreção de VEGF.

Promove a angiogénese medular, fundamental para o crescimento tumoral.²⁰⁻²³

A ligação do VEGF ao receptor tirosina cinase VEGF 1 (FLT1; *Fms-like tyrosine kinase receptor*) desencadeia a sua fosforilação, e activa as vias Ras/Raf/MEK/MAPK e PI-3K/PKC α (*protein kinase C α*) nas CM, que promovem proliferação moderada e migração acentuada, respectivamente.²⁰⁻²³

Aumenta a secreção de IL-6 pelas CEM.^{20,21}

Perturba a função das células dendríticas como apresentadoras de antígenos às células T, contribuindo para o estado de imunodepressão característico do mieloma múltiplo.^{20,21}

TNF- α (*tumor necrosis factor- α*)

O TNF- α é produzido pelas CM, CEM e células mononucleadas da MO, e a sua secreção é significativamente superior nos doentes com doença óssea.^{20,22}

O TNF- α pode induzir a apoptose das CM através da via dos receptores de morte, assim como a sua sobrevivência através da activação do NF- κ B, que condiciona: (a) aumento da expressão de factores anti-apoptóticos, nomeadamente Bcl-2, Bcl-xL, e de inibidores da apoptose, como o XIAP e os IAP's; (b) aumento da expressão de moléculas de adesão nas CM, o VLA-4 e o LFA-1 (*leukocyte-function-associated antigen 1*), e dos seus respectivos ligandos nas CEM, o VCAM-1 e o ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule 1*).^{20,22} Através da activação do NF- κ B, o TNF- α promove a adesão intercelular, que confere às CM protecção da apoptose e resistência a fármacos.

Por outro lado, o TNF- α possui um modesto efeito proliferativo indirecto mediado por: (a) ligação ao promotor génico da IL-6 nas CEM, estimulando a transcrição e a secreção de IL-6; (b) activação do NF- κ B que, por seu turno, aumenta a adesão intercelular e a secreção de citocinas pelas CEM (IL-6, IGF-1, VEGF).^{20,22}

SDF-1 α (*stromal cell-derived factor-1 α*)

O SDF-1 α é secretado pelas CEM, é o ligando do receptor de quimiocinas CXCR4 expresso pelas CM e tem função de localizá-las na MO.^{20,22}

O SDF-1 α activa as vias MEK/MAPK, PI3K/Akt e NF- κ B, induzindo proliferação moderada, migração, e protecção das CM da apoptose por Dex, respectivamente.^{20,22}

O SDF-1 α aumenta a secreção de IL-6 e VEGF pelas CEM.^{20,22}

VIA DE SINALIZAÇÃO DO NF- κ B

NF- κ B é uma denominação colectiva para uma pequena classe de factores transcricionais diméricos, que pertencem à família Rel (Reticuloendoteliose), e que têm em comum um

domínio RHD (*Rel homology domain*), através do qual se ligam ao DNA, dimerizam entre si, e que é local de ligação das moléculas inibidoras I κ B.²⁸ A classe NF- κ B está dividida em dois grupos. O primeiro inclui o p105 e o p100, que no domínio C-terminal contêm múltiplas cópias repetitivas de anquirina, com função inibidora. Por um processo de maturação proteolítica originam o p50 (NF- κ B1) e o p52 (NF- κ B2) respectivamente, que passam a ter capacidade de ligação ao DNA. O segundo grupo é composto pelos Rel (c-Rel), p65 (RelA) e o RelB, que na porção C-terminal contêm domínios de activação transcricional. As proteínas Rel/NF- κ B formam homo- e heterodímeros, que se ligam ao DNA nos sítios κ B e activam a transcrição, com excepção dos homodímeros p50 e p52 que são repressores da transcrição. O dímero p50-RelA é o mais abundante, controla a transcrição de maior número de genes e, por isso, quando falarmos em NF- κ B é a ele que nos reportamos.

O I κ B é membro de uma família de proteínas inibidoras, da qual fazem parte os I κ α , I κ β , I κ ϵ , I κ γ e Bcl-3, que contêm múltiplas regiões de homologia, que são sequências repetitivas de anquirina capazes de interacção com o domínio RHD do NF- κ B.²⁸ A formação de complexos NF- κ B-I κ B, sequestra o NF- κ B no citoplasma na sua forma inactiva.

A IKK, presente no citoplasma, é um complexo enzimático com múltiplas subunidades: IKK α e IKK β são subunidades catalíticas que formam heterodímeros, e se associam a um número desconhecido de subunidades IKK γ , que têm função reguladora.²⁸ A IKK é activada por uma multiplicidade de estímulos (citocinas pró-inflamatórias, mitogéneos, factores de crescimento, agentes indutores de *stress*) que são transduzidos por diversas vias de sinalização intracelular. As subunidades catalíticas são fosforiladas por cinases da IKK, recrutadas para o complexo IKK pelas subunidades IKK γ . A IKK fosforila o I κ B que, posteriormente, sofre poliubiquitinação e degradação pelo proteosoma 26S, libertando o NF- κ B. Este é translocado para o núcleo onde activa a transcrição de genes que promovem a sobrevivência celular: citocinas, moléculas de adesão intercelular, proteínas inibidoras da apoptose, factores anti-apoptóticos da família Bcl-2, moduladores da angiogénese e ciclina D1.

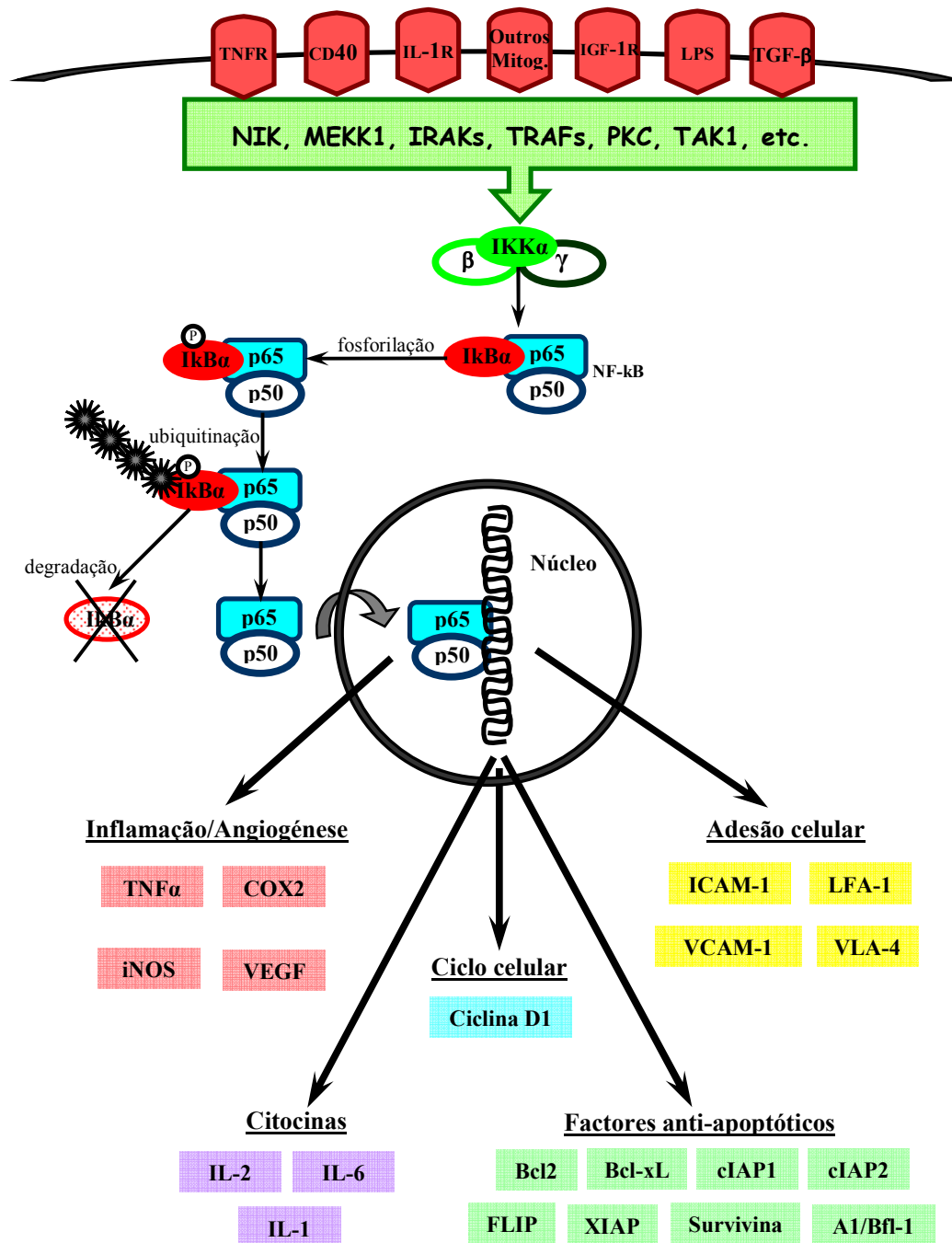


Figura 2 – Ativação do NF-κB pela IKK, que é activada por várias vias de transdução do sinal, iniciadas por diferentes estímulos. As proteínas de sinalização incluem, entre outras a NIK (*NF-κB-inducing kinase*), a MEKK1 (*Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase kinase 1*), as IRAKs [*Interleukin-1 receptor (IL-1R)-associated kinases*], os TRAFs [*Tumor necrosis factor-alpha receptor (TNFR)-associated factors*], a PKC (*Protein kinase C*) e a TAK1 [*Transforming growth factor-beta (TGF-β)-activated kinase*]. Depois, o NF-κB sofre translocação para o núcleo onde, por ligação a sítios κB do DNA, desencadeia a transcrição de vários genes envolvidos na resposta inflamatória/imune, na sobrevivência e na proliferação celulares. COX2: *ciclooxigenase 2*; iNOS: *inducible nitric oxide synthase*; LPS: *lipopolysaccharide*.

As ciclinas tipo D, em associação com as CDK4/6, promovem a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, através da fosforilação da proteína RB, com consequente libertação do factor de transcrição E2F, necessário à activação da transcrição de genes específicos da fase S. O NF- κ B, ao ligar-se ao promotor da ciclina D1, activa a sua transcrição.³⁰ Por outro lado, a inactivação do NF- κ B causa, durante a fase G1 do ciclo celular, redução e atraso da expressão de ciclina D1 e, mais importante, diminuição da actividade cinase associada à ciclina D1 com consequente atraso da fosforilação do RB. O efeito final da inactivação do NF- κ B é o retardamento marcado da progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular.

O efeito anti-apoptótico do NF- κ B está presente a dois níveis nas CM. O NF- κ B induz aumento da expressão de FLIP, cIAP-1 e cIAP-2, que inibem a activação da caspase 8 ao nível da via dos receptores de morte.³¹ Por outro lado, o NF- κ B mantém a integridade da membrana mitocondrial, evitando a activação da apoptose pela via mitocondrial, por induzir: (a) aumento da expressão dos factores anti-apoptóticos Bcl-2 e A1/Bfl-1, que dificultam a libertação do citocromo c da mitocôndria induzida por Bax; (b) aumento da expressão de XIAP que inibe a actividade da caspase 9; (c) aumento da expressão de survivina que inibe a actividade da caspase 3.

A dexametasona, a talidomida e outros IMiDs (em particular a lenalidomida), e o bortezomib são fármacos de grande valor no tratamento do MM. A sua acção anti-MM é, em parte, mediada pela inibição da actividade do NF- κ B.^{23,31} A dexametasona ligada ao receptor de glucocorticoides interfere com a actividade transcripcional do NF- κ B por um mecanismo de *tethering*: impede o contacto do p65 (RelA) com factores da maquinaria transcripcional.²³ A talidomida também inibe a actividade transcripcional do NF- κ B. O bortezomib inibe a degradação do I κ B pelo proteosoma 26S, que mantém o NF- κ B inibido e sequestrado no citoplasma.

A actividade do NF- κ B protege as CM da apoptose induzida por agentes citotóxicos. O bortezomib e o SN50, um péptido com permeabilidade celular que inibe a translocação nuclear do NF- κ B, sensibilizaram as células MM1S para a apoptose induzida pela doxorubicina³¹ e pelo TRAIL,³² um agonista dos receptores de morte DR4 e DR5.

PATOGENÉSE DA DOENÇA OSTEOLÍTICA

Dois mecanismos são importantes na osteólise: (a) A secreção de MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1 α*) pelas CM, que é factor quimiotático e de maturação dos osteoclastos. (b) A adesão das CM às CEM causa sobreexpressão de RANK-L (*RANK-ligand*) e supressão da produção de osteoprotegerina (OPG) pelas CEM, favorecendo a activação e a proliferação dos osteoclastos, e resultando em aumento da reabsorção óssea. A OPG é um receptor *decoy* solúvel secretado pelas CEM, que impede a activação dos osteoclastos por competir com o RANK-L pela ligação ao RANK (*receptor activator of NF- κ B*), expressado pelos osteoclastos.^{20,21}

INDEPENDÊNCIA DO MICROAMBIENTE MEDULAR

Nos estádios precoces da doença, as CM estão completamente dependentes do microambiente medular para a sua sobrevivência e proliferação.²⁰ O fenótipo de protecção da apoptose e de resistência a fármacos das CM é mediado pela adesão às proteínas da matriz extracelular, em particular à fibronectina, e às CEM, que induz activação do NF- κ B. Landowski e colaboradores³³ detectaram um aumento da actividade de ligação ao DNA do NF- κ B, quando CM das linhas MM1S, RPMI8226, ARH77 e NCI-H929 foram incubadas em placas de cultura revestidas por fibronectina, em comparação com células em suspensão.

O NF- κ B aumenta a expressão de: (a) moléculas de adesão intercelulares nas CM e nas CEM; (b) inibidores da actividade da caspase 8 (FLIP, cIAP-1, cIAP-2), da caspase 9 (XIAP) e da caspase 3 (survivina); (c) factores anti-apoptóticos da família Bcl-2 (Bcl-2, A1/Bfl-1).³¹ Portanto, o NF- κ B parece exercer os seus efeitos anti-apoptóticos ao nível da via dos receptores de morte e da via mitocondrial da apoptose. Por outro lado, o aumento da adesão intercelular induzida pelo NF- κ B estimula a secreção de citocinas pelas CEM (IL-6, IGF-1, VEGF), que induzem sobrevivência e proliferação das CM. As CM estão protegidas do efeito pró-apoptótico do TNF- α presente no microambiente medular, pela actividade constitucional do NF- κ B, que mantém a expressão dos inibidores da actividade

da caspase 8. Na realidade, o TNF- α induz proliferação moderada das CM, mediada pela activação da via do NF-kB.

Em fases avançadas da doença, incluindo a doença extramedular e a leucemia de plasmócitos, as CM adquirem alterações genéticas que lhes permitem tornar-se independentes do estroma medular e das citocinas para sobreviverem, proliferarem e resistirem à apoptose induzida por fármacos.^{20,34} Em CM das linhas OPM2 e RPMI8226, e em plasmócitos de doentes com MM e leucemia de plasmócitos primária, Pene e colaboradores³⁴ detectaram activação constitucional das vias PI3-K/Akt/FKHRL1/GSK-3, mTOR/S6K's e MAPK. Verificaram que a vantagem proliferativa e a protecção da apoptose dependiam fundamentalmente da activação constitucional da via PI3-K/Akt, que foi independente da acção autócrina de IL-6 em ambas as linhas celulares, e que não pode ser atribuída a diminuição da expressão de PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) nas células RPMI8226 e nos plasmócitos primários de doentes.

Cerca de 50% dos MM apresentam, durante a sua evolução, mutações activadoras de N- e/ou K-ras que conferem um fenótipo mais agressivo. A expressão ectópica dos mutantes N- ou K-ras em células da linha de MM ANBL6, que tem crescimento *in vitro* dependente de IL-6, induziu activação constitucional das vias MEK/ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), PI-3K/Akt, mTOR/S6K's e NF-kB, que tornaram o crescimento celular independente de IL-6 e concederam vantagens de sobrevivência e proliferação.³⁵ Pelo contrário, a privação de IL-6 impediu a activação do factor de transcrição STAT-3, deduzindo-se que este não é necessário à expansão de clones celulares de MM com mutação *ras*. A rapamicina, um inibidor de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) que induz paragem na fase G1 do ciclo celular, demonstrou acentuado efeito inibidor do crescimento das células ANBL6 transfectadas com *ras* mutado, em comparação com células da mesma linha celular expressando *ras wild type*, sugerindo que a vantagem proliferativa da mutação *ras* esteja relacionada com a activação constitucional da via PI-3K/Akt/mTOR.

SINALIZAÇÃO VIA mTOR

O mTOR é uma proteína cinase pertencente à família PIKK (*PI3K-related protein kinase*) porque o seu domínio catalítico tem elevada homologia com o domínio de cinase lipídica da PI-3K.³⁶ Tem função reguladora de vários aspectos do crescimento celular, nomeadamente a síntese proteica, o ciclo celular, a biogénese dos ribosomas e a transcrição génica. A estrutura do mTOR encontra-se representada na figura 3.

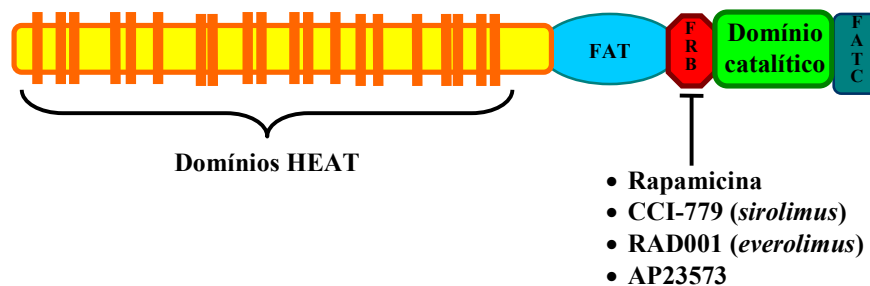


Figura 3 – Estrutura do mTOR (*mammalian target of rapamycin*). A porção N-terminal tem até 20 sequências repetitivas aos pares denominadas **domínios HEAT** de *Huntington*, *Elongation factor 3*, *A subunit of protein phosphatase 2A and TOR*. A porção C-terminal tem: **domínio FAT** de *rapamycin associated protein (ERAP) – ataxia telangiectasia mutated (ATM) – transformation/transcription-associated protein*; **domínio FRB** de *EKBP12 (FK506-binding protein) – rapamycin binding domain*; **domínio catalítico cinase**; **domínio FATC** de *FAT carboxy-terminal domain*.

Vias proximais a mTOR

O *ras* é uma proteína de ligação a GTP que activa várias cascatas de sinalização (MEK/ERK, PI-3K/Akt, NF-κB).^{30,36} A PI-3K e o *raf* são activados directamente por *ras* e estes, por sua vez, estimulam Akt/mTOR e MEK/ERK, respectivamente. Através da activação destas duas vias, o *ras* contribui para a estimulação das S6K's (*ribosomal protein S6 kinases*). Para ter actividade enzimática óptima as S6K's devem ser fosforiladas em múltiplos resíduos de forma hierárquica. A fosforilação de resíduos do domínio autoinibitório, Ser421, Thr421, Ser424, alivia a supressão e facilita as fosforilações subsequentes nos resíduos de Thr389 e Thr229. A ERK induz a fosforilação inicial dos resíduos Thr421/Ser424, para que, em seguida, a PI-3K/Akt possa induzir a

fosforilação da Thr389, sendo que ambas as actividades cinase passam por mTOR e dependem da sua integridade funcional.

As proteínas supressoras do mTOR incluem o PTEN, a AMPK (*AMP-activated protein kinase*), a LKB1 e TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis complex*).³⁶⁻³⁹ O PTEN é uma fosfatase lipídica que desfosforila os produtos da PI3-K, PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) e PIP2, e conseqüentemente reduz a activação da Akt. A expressão de PTEN é perdida em muitos tumores (p.e. glioblastomas) e síndromes de predisposição a várias neoplasias (p.e. doença de Cowden), o que resulta em aumento da actividade de mTOR.

A AMPK funciona como sensor dos níveis de energia intracelular.³⁷ Em condições de privação energética (aumento da razão AMP/ATP intracelular), a AMPK sofre fosforilação activadora pelo LKB1 e exerce repressão sobre mTOR. O LKB1 é uma Ser/Thr cinase que está frequentemente mutada na síndrome de Peutz-Jeghers, condição autossómica dominante de predisposição ao desenvolvimento de cancro, principalmente ao nível do tracto gastrointestinal.

O complexo TSC1 (hamartina) /TSC2 (tuberina) tem um papel central na regulação de mTOR: (a) liga-se a mTOR inibindo a sua actividade; (b) funciona como uma proteína GTPase de Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), sendo que quando o Rheb está ligado a GTP activa o mTOR.^{36,37} Em resposta a baixos níveis de energia o complexo TSC1/2 sofre fosforilação pela AMPK, que o estabiliza para exercer inibição de mTOR.

De modo contrário, a Akt e a ERK causam fosforilação inibidora do TSC1/2, levando a aumento da actividade mTOR. Portanto o TSC1/2 regula o mTOR na encruzilhada de sinais que recebe das vias de sinalização PI3-K/PTEN/Akt, Ras/Raf/MEK/ERK e da AMPK.³⁷

Vias distais a mTOR

O mTOR integra sinais extracelulares (factores de crescimento, citocinas e hormonas) com a disponibilidade de aminoácidos e o nível de energia intracelulares para controlar a

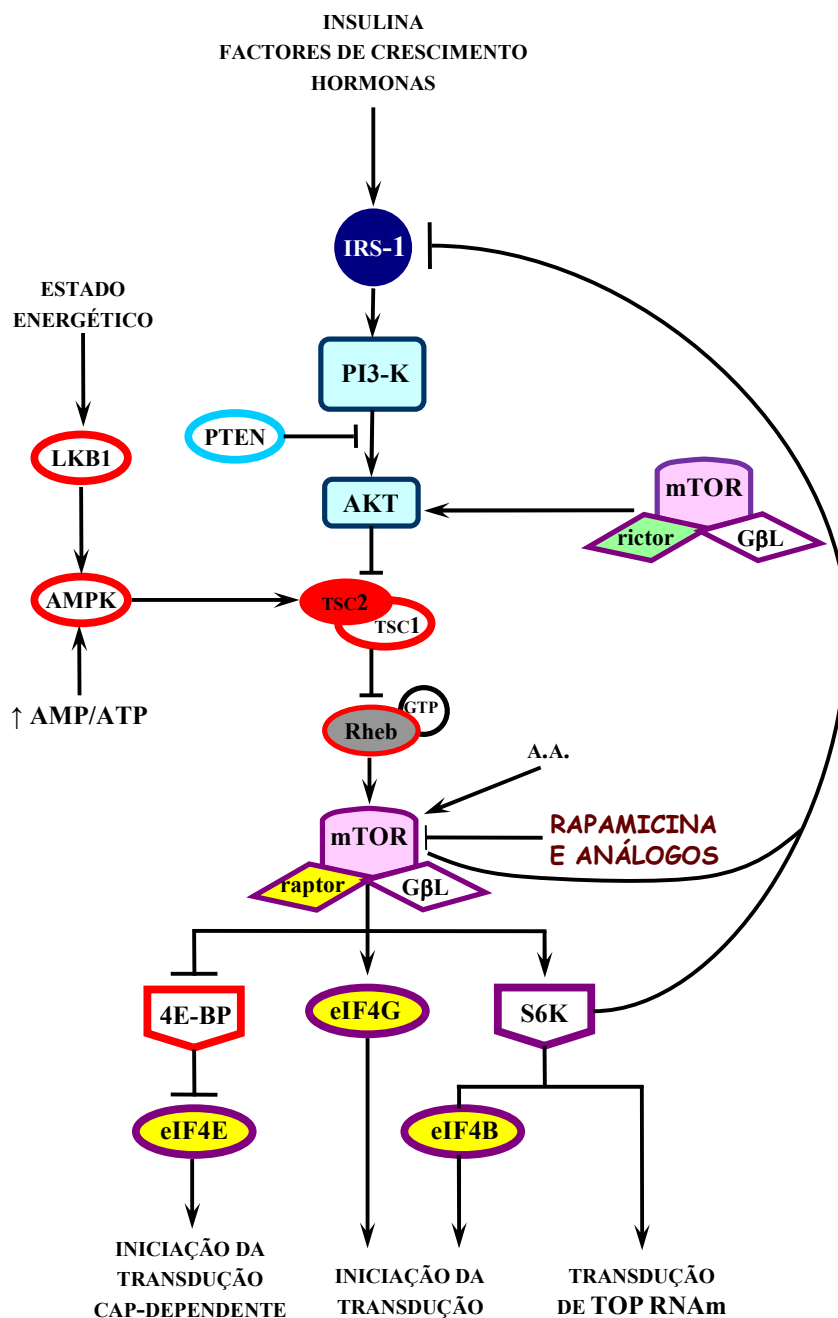


Figura 4 – Sinalização via mTOR para início da transdução proteica. O mTOR (*mammalian target of rapamycin*) regula o início da transdução através da integração de vários *inputs* diferentes. A insulina, hormonas e factores de crescimento activam a cascata de sinalização PI-3K/Akt. A Akt é fosforilada pela PI-3K e pelo complexo rictor/mTOR/GβL. O nível energético (razão AMP/ATP) modula a actividade da AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Estas vias atingem o complexo TSC1/2 (*tuberous sclerosis complex*), e regulam o mTOR via Rheb (*Ras homolog enriched in brain*). O complexo raptor/mTOR/GβL medeia a fosforilação das 4E-BP's (*eIF4E binding proteins*) e das S6K's (*ribosomal protein S6 kinases*). A inibição do mTOR pela rapamicina e os seus análogos é mostrada.

transdução proteica, através da regulação do complexo eIF4F.^{36,37} A desregulação da síntese proteica ao nível do complexo eIF4F iniciador da transdução pode estar implicada na transformação maligna.³⁷

O complexo trimérico eIF4F de factores iniciadores eucarióticos (eIF's) é constituído por eIF4E (*cap-binding protein*), eIF4G (*scaffold protein*) e eIF4A (*RNA helicase*).³⁶⁻³⁸ O complexo é necessário para iniciar a transdução proteica de RNAm dotados de uma estrutura 'cap' (m⁷GpppN) na extremidade 5', nomeadamente alguns factores de crescimento e reguladores do ciclo celular, como a ciclina D1. Recruta ribossomas carregados com RNAt, posicionando-os ao nível do codão de iniciação do RNAm, cuja estrutura 'cap' o eIF4E reconhece. Nas células em crescimento, a transdução é acelerada através de aumento do nível e da actividade do eIF4F.³⁶

Em resposta a estímulos proliferativos, o mTOR inibe factores repressores da transdução, os 4E-BP's (*eIF4E binding proteins*) que, após fosforilação pelo mTOR, libertam o eIF4E para se ligar ao complexo eIF4F e aumentar a transdução 'cap' dependente.^{36-38,40}

Na presença de estímulos proliferativos, o mTOR e outras cinases a montante activam as S6K's por fosforilação hierárquica de vários resíduos de aminoácidos, conforme referido acima.³⁶⁻³⁸ As S6K's fosforilam a subunidade S6 da proteína ribosomal 40S, condicionando um aumento da transdução de RNAm contendo uma sequência oligopirimidínica 5' terminal (RNAm 5'-TOP). Os RNAm 5'-TOP codificam proteínas ribossomais, factores de elongação, proteínas de ligação a poli-A e outros componentes da maquinaria transducional.^{37,38} As S6K's activam o factor iniciador da transdução eIF4B, que estimula o factor eIF4A a desdobrar o RNAm.³⁷ Por outro lado, as S6K's regulam o mTOR através de uma alça de *feedback* negativo que inibe o IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) por fosforilação da Ser302, e assim impede a activação da PI-3K e da AKT.^{37,40}

MECANISMOS DE ACÇÃO DA RAPAMICINA

A rapamicina é uma lactona macrocíclica isolada do fungo *Streptomyces hygroscopicus*, estruturalmente análoga do tacrolimus (FK506) que, após formar um complexo com o

receptor intracelular FKBP12 (*FK506 binding protein-12*) se liga ao mTOR, ao nível do domínio FRB (*FKBP12-rapamycin binding domain*).³⁶⁻³⁸

A transdução da ciclina D1 está dependente da via do eIF4E. A rapamicina bloqueia a transição das células da fase G1 para a fase S do ciclo celular através de vários mecanismos: (a) diminui/anula a expressão da ciclina D1, resultando em deficiência de complexos ciclina D1-CDK4, necessários para a fosforilação do RB e transição da fase G1 para a S do ciclo celular; (b) bloqueia a eliminação do p27, facilitando a formação de complexos ciclina/CDK-p27; (c) aumenta a expressão de p27 ao nível do RNAm e proteína.^{36,41} Outros mecanismos de acção da rapamicina incluem: (d) inibição das RNA polimerases I e III, que controlam a transcrição da subunidade ribossomal 5S e do RNAt, embora este efeito possa ser secundário ao bloqueio da inactivação do RB; (e) bloqueio da activação de STAT3, mediada por fosforilação pelo mTOR.³⁶

O mTOR pode formar dois tipos de complexos interagindo com três outras proteínas: Raptor (*regulatory-associated protein of TOR*), GβL e Rictor (*rapamycin insensitive component of TOR*). O complexo Raptor-mTOR-GβL (complexo mTORC1) é responsável pela inactivação das 4E-BP's e activação das S6K's a jusante, enquanto o Rictor forma o complexo Rictor-mTOR-GβL (complexo mTORC2) que fosforila a Akt, de modo a que esta atinja activação completa.^{37,40,42} O GβL liga-se ao domínio catalítico do mTOR, independentemente de Raptor e de Rictor, e estimula a sua actividade cinase em relação aos substratos S6K's e 4E-BP's.^{36,37}

O mTOR complexado com Rictor é insensível à inibição por rapamicina, ao contrário do que acontece quando o mTOR está ligado a Raptor.^{37,40,42} A exposição de células tumorais à rapamicina ou aos seus análogos pode resultar em aumento da activação de Akt e em vantagem de sobrevivência e crescimento tumorais, através de dois mecanismos: (a) fosforilação da Ser473 da Akt pelo complexo Rictor-mTOR; (b) alívio da inibição do IRS-1, exercida pelas S6K's que fosforilam a Ser302 do IRS-1,^{37,40,42} e pelo mTOR que fosforila a Ser312 do IRS-1.⁴³

ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DA RAPAMICINA

O tratamento de linhas celulares de MM com rapamicina inibiu o crescimento celular *in vitro*, efeito que foi relacionado sobretudo com a indução de paragem do ciclo celular na fase G0/G1.^{41,44} A hiperactividade da Akt torna as CM mais sensíveis à rapamicina, como acontece com a linha celular OPM2, que tem deleção de PTEN.⁴⁴

O CCI-779 (*sirolimus*), um análogo da rapamicina, inibiu significativamente o crescimento de células OPM2 e RPMI8226 injectadas subcutaneamente a ratos NOD/SCID (*non-obese diabete/severe combined immunodeficient*), em doses que condicionaram toxicidade hematológica mínima (trombocitopenia e leucopenia).⁴⁵ As respostas anti-tumorais estiveram relacionadas com: (a) inibição da proliferação, avaliada por quantificação da expressão de Ki-67 em secções do tumor; (b) indução de apoptose, quantificada através do ensaio TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick-end labeling*) em secções do tumor; (c) inibição da angiogénese, analisada por medição da densidade de microvasos, após coloração das células endoteliais com CD34. Ao nível molecular, a inibição da proliferação celular pelo CCI-779 relacionou-se com alterações da expressão da ciclina D1 (diminuição) e do p27 (aumento). A inibição de mTOR causou apoptose significativa *in vivo*, em contraste com a sua ausência *in vitro*, que pode ser explicada por inibição da angiogénese, que condiciona hipóxia tumoral.

A eficácia dos inibidores de mTOR em CM foi aumentada através da combinação com dexametasona e CC-5013 (lenalidomida).^{40,44,46} O tratamento de linhas celulares de MM (MM1S, OPM2, RPMI8226, Karpas 707, U-1958, LP-1) e células mielomatosas primárias com rapamicina potenciou a apoptose induzida pela dexametasona, contrariando parcialmente a vantagem proliferativa conferida por IGF-I e IL-6.^{41,44} A rapamicina inibiu a expressão de várias proteínas anti-apoptóticas: BAG-3, XIAP, cIAP-1 e HSP-27 (*heat shock protein 27*), possivelmente através da inibição da transdução *cap*-dependente.⁴⁴ A inibição de mTOR pela rapamicina bloqueou a fosforilação do factor inibidor da transdução 4EBP1, que manteve sequestrado o factor iniciador da transdução eIF-4E, impedindo a transdução *cap*-dependente. Pelo contrário, a rapamicina aumentou a expressão de várias proteínas pró-apoptóticas, nomeadamente p53, proteína de ligação a

p53, BIM, FasL, possivelmente por um mecanismo de transdução IRES (*internal ribosome entry sites*)-dependente. Os autores propõem que a rapamicina poderia alterar o equilíbrio entre as proteínas anti- e pró-apoptóticas, de modo que o sinal induzido pela dexametasona conseguisse atingir o limiar para desencadear a morte celular.

A talidomida e outros derivados imunomoduladores (IMiD's), em particular o CC-5013 produziram respostas anti-tumorais significativas em doentes com MM.¹⁰ A combinação de rapamicina e CC-5013 teve actividade anti-MM sinérgica, em células de linhas de MM sensíveis (MM1S, OPM2, SB645) e resistentes a agentes citotóxicos convencionais (MM1R, Dox40, LR5), e em células CD38+ da MO de doentes.⁴⁶ A rapamicina potenciou a apoptose induzida pelo CC-5013, bloqueando parcialmente os efeitos protectores conferidos pelos IGF-I, IL-6 e adesão das CM às CEM. Os dois fármacos têm acções complementares, pois bloquearam diferentes vias de sinalização: (a) o CC-5013 inibiu a activação da via MEK/ERK; (b) a rapamicina inibiu a fosforilação do STAT3; (c) ambos os fármacos inibiram a activação do NF-κB.

APOPTOSE VIA RECEPTORES DE MORTE

A apoptose, uma forma de morte celular geneticamente programada, é um evento fisiológico fundamental para a manutenção da homeostasia.^{47,48} Ao nível bioquímico, a apoptose está associada a perda do potencial da membrana mitocondrial, activação das caspases, uma família de cisteína proteases que clivam após resíduos de ácido aspártico específicos, a fragmentação do DNA e a translocação da fosfatidilserina para o folheto exterior da membrana citoplasmática.⁴⁷ A activação das caspases ocorre por duas vias principais: disfunção mitocondrial em resposta ao stress (irradiação UV, privação de factores de crescimento, lesão genotóxica, p.e. por quimioterapia) e activação de receptores de morte da membrana celular, pelos seus ligandos correspondentes.

A família génica TNF (*tumor necrosis factor*) tem funções reguladoras do desenvolvimento e do sistema imune.⁴⁷ O TNF-α e a maioria dos outros membros são proteínas transmembrana tipo II homotriméricas, que se ligam com os receptores

correspondentes da família TNFR (*TNF receptor*), induzindo a sua trimerização. Um subgrupo de receptores da família TNFR, para além dum número variável de domínios extracelulares ricos em cisteína, comuns aos membros da família TNFR, apresentam uma região citoplasmática homóloga denominada domínio DD (*death domain*), razão pela qual são chamados de receptores de morte.^{47,48} O Fas (Apo1 ou CD95) está implicado na delecção de linfócitos periféricos e o TNFR1 (p55 ou CD120a) na resposta inflamatória.

O Apo2L/TRAIL (*APO2 ligand* ou *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) é um membro da família TNF com função moduladora da apoptose no sistema imune, embora as suas funções biológicas não estejam completamente elucidadas.^{47,49} O Apo2L/TRAIL é largamente expresso em tecidos humanos, e interage com quatro receptores celulares da família TNFR: o DR4 (*death receptor 4*) e o DR5/TRICK2/KILLER, que têm domínios DD citoplasmáticos e medeiam a apoptose, o DcR1 (*decoy receptor 1*, TRID ou LIT), que é uma proteína da superfície celular ancorada a glicosilfosfatidilinositol, e o DcR2 (*decoy receptor 2* ou TRUNDD), que tem um domínio DD citoplasmático truncado não sinalizador da apoptose. Os receptores de morte DR4 e DR5 também são largamente expressos na maioria dos mesmos tecidos do seu ligando.⁴⁷ O Apo2L/TRAIL também tem capacidade de se ligar à osteoprotegerina, um receptor secretado solúvel da família TNFR, cujo ligando, OPGL/RANKL/TRACE, é homólogo do TNF.

O mecanismo da apoptose iniciada pelo APO2L/TRAIL parece ser semelhante ao do FasL.^{47,50,51} Um homotrímero de APO2L/TRAIL, ao interagir com os seus receptores de morte, induz formação de complexos homo- e heterotriméricos de DR5 e DR4.⁵⁰ Os complexos Apo2L/TRAIL-DR4/DR5 recrutam FADD (*Fas-associated death domain protein*) e pró-caspase 8, levando à formação do DISC (*death-inducing signaling complex*). O FADD e DR4/DR5 interagem através dos respectivos domínios DD. A pró-caspase 8 e o FADD interagem através dos domínios DED (*death effector domain*). Os zimogénios da caspase 8 autoclivam-se, devido à sua proximidade no DISC. A caspase 8 activada cliva as caspases efectoras (caspases 3, 6 e 7) a jusante, que executam a morte celular.^{47,50-52}

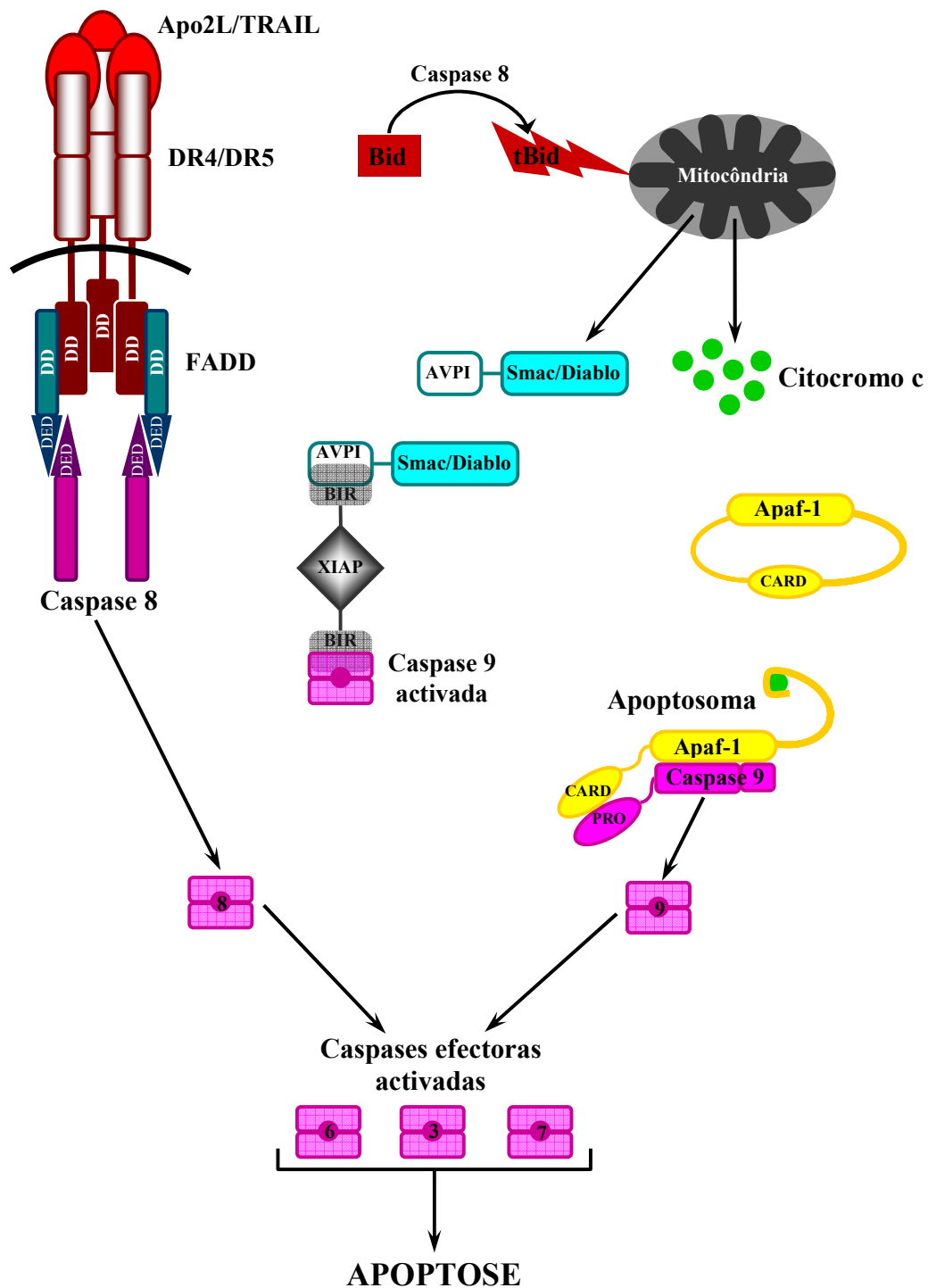


Figura 5 – Vias de sinalização da apoptose, pelos receptores de morte DR4 e DR5 (via extrínseca), e pela mitocôndria (via intrínseca). Apaf-1: *apoptotic protease-activating factor 1*; **AVPI:** sequência dos quatro primeiros aminoácidos do Smac/Diablo que se liga ao domínio BIR dos IAPs (*inhibitor of apoptosis protein*); **BIR:** *baculovirus IAP repeat*; **CARD:** *caspase-recruitment domain*; **DD:** *death domain*; **DED:** *death effector domain*; **DR4/DR5:** *death receptor 4 and 5*; **FADD:** *Fas-associated death domain*; **Smac/Diablo:** *second mitochondria-derived activator of caspase/direct-IAP binding protein with low pI*; **XIAP:** *X chromosome-encoded IAP*.

A ligação de TNF- α ao seu receptor (TNFR1), induz o recrutamento de TRADD (*TNFR-associated death domain protein*), a molécula adaptadora que, por sua vez, recruta o TRAF-2 (*TNFR-associated factor 2*) e o RIP (*receptor-interacting protein*), que conduzem à activação do NF- κ B e da JNK (c-Jun N-terminal kinase) /AP-1.^{47,48} O NF- κ B e o AP-1 induzem a transcrição de genes pró-inflamatórios e imunomoduladores. No caso da síntese proteica estar bloqueada, o TRADD recruta o FADD e a caspase 8, iniciando a apoptose. Portanto, o FADD parece ser a molécula adaptadora universal para os receptores de morte.^{47,50-52}

A caspase 8 está indubitavelmente envolvida na sinalização através do DISC do Apo2L/TRAIL, embora seja controverso que a caspase 10 seja recrutada para o DISC. Enquanto uns autores não detectaram caspase 10 no DISC do TRAIL precipitado de células BJAB⁵⁰ nem células BL60⁵¹ (linhas de linfoma B humano), outros⁵³ identificaram-na ao nível do DISC induzido pelo tratamento com TRAIL de células T Jurkat (linha celular de linfoma T humano) e células HeLa (linha celular de carcinoma cervical humano).

Os autores divergem quanto à capacidade dos receptores DR4 e DR5 interagirem com as várias moléculas adaptadoras. Chaudhary e colaboradores⁵² demonstraram que a expressão ectópica dos receptores DR5 e DR4 condicionava activação significativa do NF- κ B nas células 293T (células de rim embrionário humano contendo o antigénio T do SV40), e que a cotransfecção de um mutante do TRADD com deleção N-terminal de parte do domínio de ligação ao TRAF2 (mutante dominante negativo), bloqueava a activação do NF- κ B. Ambos os receptores de morte coimunoprecipitaram o FADD, o TRADD e o RIP cotransfectados em células 293T, pelo que os autores concluíram que os receptores DR4 e DR5 podem interagir directamente com essas moléculas. Contrariamente, outros investigadores não detectaram TRADD nem RIP endógenos no DISC do Apo2L/TRAIL, coimunoprecipitados das linhas celulares BJAB⁵⁰ e BL60⁵¹. Como as interacções entre os receptores de morte do TRAIL e as moléculas adaptadoras TRADD e RIP foram observadas em experiências de cotransfecção, é possível que quantidades anormalmente grandes de receptores e de adaptadores determinassem associações entre os respectivos domínios DD, que não interagem fisiologicamente.⁴⁸ As

doses de Apo2L/TRAIL necessárias para causar alguma activação do NF- κ B são consideravelmente superiores a doses do TNF- α que induzem a sua forte activação.

A expressão ectópica dos receptores DcR1 e DcR2 protegeu células sensíveis da apoptose induzida pela exposição ao TRAIL.^{48,49,53} No estudo por Mérimo e colaboradores,⁵³ o DcR1 expressado endogenamente em monócitos, e ectopicamente em células T Jurkat e HeLa transfectadas, localizou-se predominantemente em *rafts* lipídicos e actuou por competição pela ligação a TRAIL, deste modo sequestrando quantidade substancial do fármaco para estes domínios da membrana plasmática, impedindo a formação do DISC. A exposição a TRAIL das mesmas linhas celulares transfectadas com vector de expressão de DcR2, levou à formação dum DISC composto pela interacção de DcR2 e DR5, que recrutou caspase 8 mas inibiu a sua clivagem, bloqueando a activação da cascata da apoptose. No estudo por Degli-Esposti e colaboradores,⁴⁹ a transfecção das células CVI/EBNA (células epiteliais de rim de macaco) com receptor DcR2 activou NF- κ B, mecanismo ao qual foi atribuída a capacidade desse receptor *decoy* conferir resistência à apoptose induzida por TRAIL.

Amplificação da apoptose pela via mitocondrial

As células podem ser classificadas como tipo I e II, dependendo da contribuição mitocondrial para a apoptose mediada por receptores de morte.⁵⁴ Nas células tipo I, a caspase 8 activada pela ligação dos agonistas (p.e. TRAIL) aos seus receptores de morte é suficiente para causar apoptose, enquanto nas células tipo II a quantidade de caspase 8 activada ao nível do DISC não é suficiente, e a mitocôndria actua como “amplificadora” do sinal apoptótico. Nas células tipo II a apoptose é sensível à inibição por Bcl-2 e Bcl-xL, que impedem a libertação do citocromo c pela mitocôndria, e por inibidores da caspase 9.

Em linhas celulares de MM tratadas com Apo2L/TRAIL, a clivagem das caspases 8 (apical) revelou-se fulcral para a indução da apoptose, visto que a inibição da sua forma activada pelo IETD-FMK (inibidor específico da caspase 8) anulou a apoptose induzida pelo fármaco.⁵⁵ A activação da via mitocondrial também ocorreu em CM tratadas com

Apo2L/TRAIL, conforme evidenciado pela clivagem das caspases 9, embora a sua função pareça ser redundante, pois a inibição da caspase 9 pelo LEHD-FMK (inibidor específico da caspase 9) não protegeu as células da morte induzida pelo fármaco. A apoptose induzida por Apo2L/TRAIL não foi bloqueada por Bcl-2, quer em células de linhas de MM (RPMI8226, ARP-1) transfectadas com um vector de expressão de Bcl-2, quer em células primárias de doentes que expressavam elevados níveis de Bcl-2, o que suporta o conceito de que a activação da via mitocondrial não é fundamental para o efeito apoptótico do fármaco nas células mielomatosas.⁵⁶

O Bid, uma proteína da família *BH3-only*, é clivado pela caspase 8 a nível citosólico.⁵⁴ O Bid truncado (Bidt) sofre translocação para a membrana mitocondrial, induzindo a libertação do citocromo c. O Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*), de localização citosólica, ao complexar-se com o citocromo c libertado pela mitocôndria, vê a sua afinidade por dATP/ATP grandemente aumentada, o que desencadeia a oligomerização dos complexos Apaf-1/citocromo c. Os domínios CARD (*caspase-recruitment domain*) do Apaf-1 são expostos, recrutam múltiplas moléculas de pró-caspase 9 com formação do apoptosoma, facilitando a sua autoclivagem.^{54,57}

Outras proteínas apoptogénicas, como o AIF (*apoptosis-inducing factor*) e a endonuclease G, libertadas do espaço intermembranar da mitocôndria, são capazes de induzir a morte celular por vias independentes da activação das caspases.⁵⁴

O Smac/Diablo (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct-IAP binding protein with low pI*) é outra proteína mitocondrial libertada para o citoplasma que, através duma sequência inicial de quatro aminoácidos (AVPL [Ala-Val-Pro-Ile]), se liga aos domínios BIR (*baculovirus IAP [inhibitor of apoptosis protein] repeat*) dos IAP's, impedindo-os de inibir as caspases activadas.⁵⁴ O XIAP (*X chromosome-encoded IAP*) é capaz de inibir a caspase 9, e as caspases efectoras 3 e 7. O Smac compete pela ligação aos domínios BIR do XIAP, implicados na inibição dessas caspases.

Na ausência de factores de sobrevivência, o domínio BH3 do Bad está desfosforilado e interage com as proteínas anti-apoptóticas da família Bcl2 (Bcl2 e Bcl-xL) ao nível da membrana mitocondrial exterior, inactivando-as.⁵⁴ Deste modo, o Bax e o Bak, proteínas

mitocondriais pró-apoptóticas da família Bcl-2, sob a influência do Bidt e de outras proteínas *BH3-only*, sofrem alterações conformacionais e oligomerização, permitindo a saída das proteínas apoptogénicas do espaço intermembranar da mitocôndria, seja através da formação dum poro ou de desestabilização da membrana mitocondrial exterior.^{54,57}

Em última instância, após a libertação do citocromo c pela mitocôndria, a célula fica condenada a morrer, seja através de rápida apoptose mediada pela activação das caspases, ou através dum mecanismo de necrose mais lento, conseqüente ao comprometimento do transporte de electrões, da fosforilação oxidativa e da produção de ATP, causado pela depleção mitocondrial de citocromo c.^{54,57}

Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) têm uma função reguladora da apoptose pela via mitocondrial, sendo capazes de neutralizar as acções das proteínas *BH3-only* (Bidt, Bim), e de bloquear a oligomerização do Bax e do Bak.⁵⁴

O Mcl-1 (*myeloid cell factor-1*) foi identificado como gene de indução precoce durante a diferenciação de células mielóides da linha ML-1.⁵⁸

A transfecção de células HeLa com Mcl-1 protegeu-as da apoptose induzida pelo TRAIL⁵⁹, e pelo Bidt⁵⁸ em experiências de cotransfecção. Contrariamente, o silenciamento do Mcl-1 de células HeLa através da infecção com lentivirus contendo um vector de expressão de RNAs (small hairpin) Mcl-1, potenciou a apoptose induzida por TRAIL em ambos os tipos celulares.⁵⁹

O tratamento de mitocôndrias isoladas de células HeLa com Mcl-1 inibiu a libertação de citocromo c induzida por Bidt,⁵⁹ resultado sobreponível ao obtido em mitocôndrias de células HeLa cotransfectadas com Mcl-1 e Bidt⁵⁸.

Em vários tipos celulares tumorais (células T Jurkat, HCT116, CAMA-1 e HeLa), a apoptose induzida por TRAIL esteve associada à degradação do Mcl-1 e do Bid, e portanto está dependente da activação da via mitocondrial para amplificação da apoptose.^{58,60} A identidade da caspase implicada na clivagem do Mcl-1 é controversa. Weng e colaboradores,⁵⁸ pelos resultados obtidos em ensaios de clivagem de caspases *in vitro*, utilizando formas activas de caspases recombinantes humanas e Mcl-1 purificado,

concluíram que a caspase 3, mas não a caspase 8, era capaz de clivar o Mcl-1. Num estudo posterior, Han e colaboradores⁶⁰ verificaram que o tratamento de células Hct116 (linha celular de carcinoma do cólon) Bax^{-/-} com TRAIL, induziu clivagem do Mcl-1, obrigatoriamente pela caspase 8, porque tratando-se de células Bax-nulas, a activação da via mitocondrial está bloqueada e as caspases 3 e 7 não sofrem activação. A clivagem do Mcl-1 pelas caspases 8 e/ou 3 originou dois fragmentos C-terminais, com pesos moleculares respectivamente de 27 kDa e 19 kDa.⁵⁸ Também não é consensual que os fragmentos C-terminais do Mcl-1 tenham capacidade para activar a via mitocondrial da apoptose.^{58,60}

O Mcl-1 pode interagir com o Bidt,^{71,72} com o Bak⁷² e com o Bim,⁷³ ao nível da membrana mitocondrial exterior. No estudo por Clohessy e colaboradores,⁷² o Bak foi deslocado dos complexos Mcl-1-Bak pelo Bidt transfectado em células HeLa.

Em condições não-apoptóticas, o Mcl-1 sequestra o Bim, uma proteína *BH3-only*, ao nível da membrana mitocondrial.⁶⁰ Durante a apoptose desencadeada por TRAIL, o Mcl-1 sofre clivagem pelas caspases e liberta o Bim que, por sua vez, induz a oligomerização de Bax e Bak, com consequente permeabilização da membrana mitocondrial às proteínas apoptogénicas (Citocromo c, Smac/Diablo, HtrA2). O silenciamento do Mcl-1 de células CAMA-1 (linha celular de carcinoma da mama) através da transfecção de RNAsi Mcl-1, potenciou a apoptose e a despolarização da membrana mitocondrial induzidas por TRAIL, enquanto o silenciamento do Bim com RNAsi teve efeitos contrários. As mitocôndrias isoladas de células HeLa transfectadas com RNAsi Mcl-1, libertaram maiores quantidades de proteínas apoptogénicas em resposta ao tratamento com Bim, do que as mitocôndrias de células HeLa *wild type* e de células HeLa transfectadas com Mcl-1.

OBJECTIVOS

O MM é a segunda neoplasia hematológica mais frequente. As remissões a longo prazo são raras, mesmo após quimioterapia em alta dose seguida de resgate com células progenitoras hematopoiéticas. Novas estratégias terapêuticas dirigidas a alvos

moleculares são necessárias para melhorar o prognóstico uniformemente fatal desta doença.

A rapamicina, ao inibir o mTOR, teve um efeito essencialmente citostático e foi incapaz de ultrapassar completamente a protecção conferida por IGF-1, IL-6 e a adesão às CEM, pelo que o seu benefício no tratamento do MM poderá ser maximizado através da combinação com agentes citotóxicos ou com inibidores de moléculas-alvo pertencentes a outras vias de sinalização intracelulares, mediadoras do crescimento e a sobrevivência das CM. Pelo menos duas combinações racionais da rapamicina com outros fármacos revelaram-se sinérgicas: a rapamicina potenciou a apoptose induzida pela lenalidomida⁴⁶ e pela dexametasona.^{41,44}

Os plasmócitos malignos são células com sobrevivência prolongada e baixo índice proliferativo, pelo que fármacos indutores de apoptose, como o TRAIL, um agonista dos receptores de morte DR4 e DR5, pode ser especialmente eficaz na sua erradicação. O TRAIL tem um potencial terapêutico inestimável, porque induziu apoptose das CM poupando as células normais, incluindo as células mononucleares da MO e do sangue periférico (SP).³² Por outro lado, a IL-6 não protegeu as CM da apoptose induzida por TRAIL. Finalmente, ao contrário do TNF- α e do FasL, o TRAIL solúvel humano teve escassa toxicidade quando administrado sistemicamente a ratos e a primatas não-humanos.⁴⁷

Com base nestes resultados favoráveis, decidimos estudar os efeitos que a combinação da rapamicina com o Apo2L/TRAIL produz *in vitro* sobre linhas celulares de MM. Esperávamos que a rapamicina, ao bloquear o mTOR, pertencente à via de sobrevivência e proliferação PI3-K/Akt/mTOR, potenciase a apoptose induzida pelo Apo2L/TRAIL, que activa a via dos receptores de morte presentes à superfície celular.

MATERIAL E MÉTODOS

REAGENTES E IMUNOQUÍMICOS

Nas culturas celulares empregamos meio de cultura RPMI1640, soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina.

A rapamicina foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO). O Apo2L/TRAIL recombinante humano solúvel foi descongelado e diluído em meio de cultura imediatamente antes de ser utilizado dada a instabilidade da molécula.

A anexina V conjugada à alofocianina (APC) foi utilizada para quantificar a apoptose e o iodeto de propídio (IP) para estudar a distribuição celular pelas fases do ciclo celular, ambas por citometria de fluxo.

Para os estudos de proteínas por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e *western blotting*, recorreremos aos seguintes anticorpos monoclonais: anti-caspase 8, anti-caspase 9, anti-caspase 3, anti-PARP, anti-Bcl2, anti-Mcl-1, anti-DR4, anti-DR5 e anti-FADD. Os anticorpos secundários estavam conjugados a peroxidase. As membranas de PVDC (*polyvinylidene difluoride*) foram da Millipore.

Para as experiências de precipitação do DISC por afinidade de ligando, utilizamos a Sulfo-NHS-LC-Biotina para biotinar o TRAIL, e as bolinhas de estreptavidina para precipitar os complexos TRAIL-DISC.

Na quantificação dos receptores de morte do TRAIL à superfície celular por citometria de fluxo, usamos anticorpos monoclonais anti-DR4 e anti-DR5 conjugados com ficoeritrina (PE), que tinham a capacidade de bloquear a apoptose induzida pela ligação do TRAIL aos seus receptores de morte.

CULTURAS CELULARES

As linhas celulares MM1S e MM1R foram cedidas pelo Dr. S.T.Rosen (Chicago, IL), as linhas OPM2 e MM144 pelo Dr. S. Rudikoff (Bethesda, MD), e as linhas U266 e RPMI8226 pelo Dr. W. Dalton (Tampa, FL).

Todas as linhas celulares de MM (MM1S, MM1R, U266, RPMI8226, OPM2, MM144) foram cultivadas no meio RPMI1640 com L-glutamina, suplementado com antibióticos (penicilina a 100 U/mL, estreptomicina a 100 µg/mL) e com soro fetal bovino a 10%, à temperatura de 37°C, em atmosfera humidificada e na presença de 5% CO₂/95% de ar.

ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO, CICLO CELULAR E APOPTOSE

Ensaio de MTT

O efeito de várias concentrações de rapamicina, de Apo2L/TRAIL e da combinação dos dois fármacos sobre a proliferação celular de linhas de MM foi examinada através do ensaio colorimétrico com o corante de tetrazólio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio].

Primeiro, procedemos à determinação da concentração de células em suspensão de meio de cultura através da determinação da média de quatro contagens microscópicas de células viáveis em quatro campos dum hemocitómetro (placa de Neubauer), com recurso à coloração das células lesadas com *Trypan Blue*, que penetra nas células com perda de integridade da membrana.

Nos ensaios de MTT foram usadas placas de cultura com 45 poços e plaqueadas 50000 células/ poço (i.e., 200µL de suspensão de células em meio de cultura). Em cada experiência foi incluída uma série de quatro poços controlo, que continham unicamente a suspensão de células. Os fármacos foram adicionadas numa concentração micromolar em vez de nanomolar, para diminuir 1000X o volume adicionado, pois a rapamicina é conservada em DMSO, que é tóxico para as células, podendo ser parcialmente responsável pela diminuição de viabilidade celular verificada nas condições que incluíssem esse fármaco. Nas experiências que envolveram o tratamento de células com rapamicina, foi incluída uma série adicional de quatro poços controlo, nos quais as células foram incubadas com 1 µL de DMSO.

Após a adição dos fármacos, as células foram incubadas durante 24 e 48 horas, nas condições referidas acima. Duas horas antes de perfazer o tempo limite de incubação, o

corante MTT (cor amarela) foi adicionado a cada condição da experiência, permitindo que as células viáveis o reduzissem a um formazano, que forma um precipitado azulado em solução aquosa. A quantidade de MTT-formazano pode ser determinada espectrofotometricamente, após solubilização pela adição de uma solução de ácido clorídrico em SDS (*sodium dodecyl sulfate*) e agitação leve.

Os resultados de cada condição da experiência representam a média \pm desvio padrão dos valores das diferenças de absorbância, medidas em dois comprimentos de onda (630 nm e 570 nm), em cada quatro poços com a mesma condição da experiência.

Considerando a média das diferenças de absorbância dos quatro poços controle como 100%, ou seja, nessa condição um número máximo de células permanecem viáveis, pelo que a metabolização do MTT é máxima, as percentagens de captação de MTT em cada condição da experiência são directamente proporcionais ao número de células viáveis.

Coloração com anexina V (AV)/iodeto de propídio (IP)

Para cada linha celular de MM, MM1S e OPM2, um milhão de células por cada condição da experiência foram cultivadas em placas de 6 poços e tratadas com rapamicina (50 nM, 100 nM), com Apo2L/TRAIL (50 ng/mL, 100 ng/mL) e com a combinação dos dois fármacos, durante 24 e 48 horas, conforme a experiência considerada.

A apoptose causada pelos fármacos foi quantificada por citometria de fluxo após coloração com anexina V-APC. Os resíduos de fosfatidilserina sofrem translocação do folheto interior para o exterior da membrana plasmática em estadio precoce da apoptose, tornando-se acessíveis à anexina V, uma proteína de ligação a fosfolípidos dependente de cálcio, que mantém a sua afinidade pela fosfatidilserina quando conjugada ao fluorocromo APC.

Em cada experiência foram incluídas duas condições de controlo. O controlo negativo, constituído pela suspensão de células em meio de cultura, permite quantificar a apoptose basal causada pela manipulação das células durante o procedimento técnico. No controlo

positivo, as células foram tratadas com pemetrexato, um fármaco que se sabe causar apoptose quase completa das CM em cultura.

Sucintamente, as células de cada condição da experiência foram lavadas com PBS (*phosphate-buffered saline*) e ressuspendidas em 1 mL de *binding buffer* [10mmol/L de HEPES/NaOH (pH 7,4), 140 mmol/L de NaCl, 2,5 mmol/L de CaCl₂], para fixação e paragem de qualquer apoptose adicional. Depois, as células foram incubadas com 5µL de anexina V-APC e 10µL de IP, durante 15 minutos a temperatura ambiente, em local escuro. A coloração com IP destina-se a identificar as células necróticas e em estágio avançado da apoptose que, por terem perdido a integridade da membrana, permitem a penetração do corante e a sua intercalação no DNA.

Finalmente, as amostras foram lidas em citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) usando o programa *CELLquest*.

Coloração do DNA com IP

Esta técnica foi utilizada para estudar as alterações na distribuição de células MM1S e OPM2 ao longo do ciclo celular causadas pelo tratamento com rapamicina a 50 nM, durante 24 e 48 horas.

Para cada linha celular, dois milhões de células por cada condição da experiência foram cultivadas em placas de seis poços e tratadas com rapamicina durante 24 e 48 horas.

Após efectuar uma lavagem com PBS, as células de cada condição da experiência foram fixadas com 800µL de etanol a 70% a -4°C *overnight*. Após duas lavagens com PBS, o RNA celular foi sujeito a digestão pela adição de 10µL de RNase a cada condição da experiência, pois o IP intercala-se tanto no DNA como no RNA. Finalmente, as amostras foram incubadas com 10µL de IP durante uma hora à temperatura ambiente, em local escuro.

A proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular foi determinada por citometria de fluxo, recorrendo ao programa *CELLquest*.

SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

Os níveis de expressão e a magnitude da clivagem das pró-caspases 8, 9 e 3, do PARP [*poly(ADP-ribose) polymerase*], do Bcl2 e do Mcl-1 foram avaliados por *western blot*, em células MM1S tratadas com rapamicina a 100 nM, TRAIL a 100 ng/mL, e com a combinação de ambos os fármacos nas mesmas concentrações, durante 6 e 12 horas .

Os níveis de expressão dos receptores de morte do TRAIL (DR4, DR5) foram analisados por *western blot*, em células MM1S tratadas com rapamicina a 50 nM e com TRAIL a 50 ng/mL, durante 3, 6 e 12 horas, respectivamente, e comparados com os níveis determinados num controlo negativo, constituído por células MM1S não-tratadas.

Para cada condição da experiência, 2 milhões de células MM1S foram cultivadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro/8mL de capacidade, incubadas com cada um dos fármacos isoladamente, e com a combinação de ambas, nas concentrações e pelos tempos acima indicados.

Depois, as células foram recolhidas, lavadas com PBS e lisadas a -4°C, durante 30 minutos em 0,5 mL de *lysis buffer* (NaCl 140 mM, EDTA [ácido etilenodiaminotetracético] 10 mM, glicerol a 10%, Nonidet P-40 a 1%, Tris [tris(hidroximetil)aminometano], pH 7, 20 mM, pepstatina 1 µM, aprotinina 1 µg/mL, leupeptina 1 µg/mL, ortovanadato de sódio 1 mM). Após microcentrifugação a 13 000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante das amostras foi recolhido para novos tubos *Eppendorfs* de 1,5 mL.

As proteínas dos extractos celulares totais foram quantificadas pela técnica de Bradford (colorimétrica), após calibração do espectrofotómetro laser pela construção dum recta padrão de absorbâncias a partir de amostras de concentrações conhecidas crescentes de albumina sérica bovina (BSA).

Foram preparados géis de SDS-poliacrilamida a 12% (H₂O, acrilamida a 30%, Tris, pH 8,8, 1,5M, SDS [*sodium dodecyl sulfate*] a 10%, APS [persulfato amónico] a 10% e TEMED) de tamanho adequado ao volume e número das amostras.

As amostras foram preparadas com uma quantidade de proteína (50 µg) e com um volume final iguais, foi adicionado o *sample buffer* (Tris pH 6.8., 200 mM, SDS 8%, azul de bromofenol 0,05%, glicina a 40%) activado com β-mercaptoetanol (200 µL/10 mL de *sample buffer*), num volume correspondente a 1/3 do volume final das amostras. Antes de serem carregadas nos poços do gel, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 3 minutos, procedimento que juntamente com a acção do *sample buffer* desnatura as proteínas, permitindo que corram no gel.

As amostras proteicas foram sujeitas a electroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), aplicando uma voltagem constante de 100v, seguida de transferência para uma membrana de PVDC, *overnight* a voltagem variável conforme o tamanho do gel (14-20v).

A membrana, após incubação durante 1 hora em solução de bloqueio (BSA a 1%, azida sódica a 0,05% diluídos em solução de *western blot*), foi exposta durante 2 horas ao anticorpo primário, diluído na concentração indicada pelo fabricante, em solução de *western blot* (NaCl 5M, Tris-HCl pH 7.5, 1M, e Tween 20 a 10%, diluídos em água miliQ). Após três lavagens de 7 minutos em solução de *western blot*, a membrana foi incubada por 30 minutos com o anticorpo secundário respectivo, marcado com peroxidase, dirigido à porção espécie-específica do anticorpo primário, numa diluição de 1:10 000 (anti-rato) e de 1:20 000 (anti-coelho).

Após três lavagens adicionais, incubámos a membrana durante 60 segundos numa mistura de H₂O₂ (o substrato da peroxidase) e solução de revelação (luminol 390 µg/mL, 4-iodofenol 475 µg/mL, diluídos em Tris pH 9.35, 0,1M), na diluição de 1:20000. Finalmente, em câmara escura, expusemos uma película fotográfica à membrana com as bandas de proteínas, por tempos adequados.

PRECIPITAÇÃO DOS COMPLEXOS BIO-TRAIL-DISC

O TRAIL biotinizado (Bio-TRAIL) foi preparado por incubação de TRAIL a 1 mg/mL com Sulfo-NHS-LC-Biotina a 1 mg/mL durante 1 hora em gelo, antes da reacção ser parada pela adição de Tris-HCl 1 M, pH 7.5.

Por cada condição da experiência, foram cultivadas em placas de *Petri* de 10 cm de diâmetro/8 mL de capacidade 60 milhões de células MM1S. Numa condição, as células foram incubadas com Bio-TRAIL a 1µg/mL durante 30 minutos, e noutra foram pré-tratadas com rapamicina 1000 nM durante 30 minutos e, em seguida, incubadas com Bio-TRAIL a 1µg/mL por 30 minutos adicionais. Foi incluída uma condição de controlo negativo, constituída por células não-tratadas.

As células foram recolhidas, lavadas três vezes com PBS, que pára a formação do DISC, e lisadas com 3 mL de *lysis buffer* (composição igual à do usado para preparação dos extractos celulares totais), a -4°C durante 30 minutos. Os lisados foram centrifugados e os sobrenadantes recolhidos.

Os complexos Bio-TRAIL-DISC foram precipitados dos sobrenadantes através da incubação com 35 µL bolinhas de estreptavidina, a 4°C em rotação *overnight*. No dia seguinte, centrifugámos as amostras, eliminámos os sobrenadantes, e lavámos os precipitados seis vezes antes de proceder à eluição dos complexos Bio-TRAIL-DISC das bolinhas de estreptavidina, pela adição de 30 µL de *sample buffer* e aquecimento das amostras a 100°C durante 5 minutos. Após centrifugarmos as amostras, os sobrenadantes foram carregados num gel de SDS-poliacrilamida a 10% e submetidos a electroforese.

Os *western blots* realizados, permitiram comparar o recrutamento de pró-caspase 8 e de FADD para o DISC, e a clivagem da caspase 8, entre células tratadas com TRAIL isolado e células tratadas com a combinação de TRAIL e rapamicina.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DO TRAIL POR CITOMETRIA DE FLUXO

A expressão superficial dos receptores de morte do TRAIL, DR4 e DR5, foi determinada em células MM1S tratadas com rapamicina, com TRAIL e com a combinação dos dois fármacos, e comparada com a expressão basal dos mesmos receptores em células não-tratadas.

Para cada condição da experiência, dois milhões de células MM1S foram cultivadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro /8 mL de capacidade e tratadas com rapamicina a 50 nM, com TRAIL a 50 ng/mL e com a combinação dos dois fármacos nas mesmas concentrações, durante 12 horas. Na experiência, foram incluídas duas condições de controlo negativo, constituídas por células MM1S cultivadas nas mesmas condições, sem adição de qualquer fármaco. Um controlo negativo serviu para caracterizar a expressão superficial dos receptores do TRAIL nas células MM1S em condições basais. Ao outro controlo negativo não adicionámos qualquer anticorpo, funcionando como um controlo isotípico.

Após tratamento, as células de cada condição da experiência foram recolhidas, lavadas com PBS por duas vezes, e ressuspendidas em 200 µL de PBS. Cada amostra, correspondendo a uma condição da experiência, foi dividida por dois tubos *Eppendorf*, sendo que no final ficamos com 1 milhão de células suspensas em 100 µL de PBS por cada tubo, para testar cada um dos anticorpos monoclonais. Cada amostra foi incubada com 20 µL dum anticorpo, anti-DR4 ou anti-DR5, durante 30 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após uma lavagem com PBS, cada amostra foi ressuspendida em 500 µL de PBS, transladada para um tubo de vidro e lida num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) usando o programa *CELLquest*.

RESULTADOS

A rapamicina inibiu o crescimento de linhas celulares de MM

A resposta de CM a concentrações crescentes de rapamicina (0,1-100 nM) foi avaliada em seis linhas de MM: MM1S, MM1R, U266, RPMI8226, OPM2, MM144.⁶¹ O número relativo de células viáveis após incubação durante 48 horas com o fármaco foi quantificado através do ensaio de MTT, descrito em “Materiais e Métodos”.

A rapamicina reduziu o crescimento de todas as linhas celulares de MM de forma dependente da dose (figura 6). A inibição do crescimento das CM situou-se entre 30% e 70% usando uma concentração de rapamicina de 10 nM. A concentração de 100 nM condicionou escassa inibição adicional do crescimento celular. As células mais sensíveis foram as OPM2 e MM1S, enquanto as células RPMI8226 e U266 se comportaram de forma relativamente mais resistente.

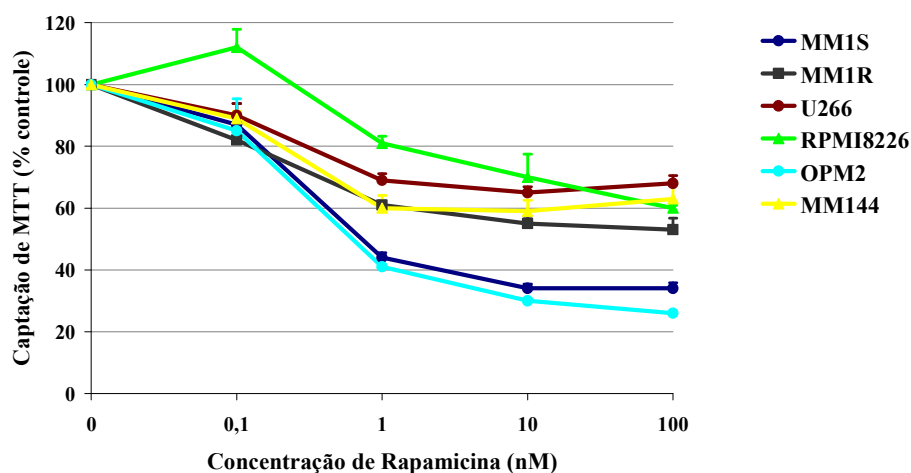


Figura 6 – Efeito da rapamicina na viabilidade de linhas celulares de MM. As linhas celulares MM1S, MM1R, U266, RPMI8226, OPM2 e MM144 foram incubadas com as concentrações indicadas de rapamicina, durante 48 horas. A percentagem de células viáveis foi determinada pela quantificação da capacidade de redução do corante de tetrazólio MTT pelas células remanescentes, através de método espectrofotométrico. Os resultados são a média \pm DP de 4 determinações para cada condição da experiência, expressos como percentagem dos valores correspondentes a células não-tratadas (controlo negativo).

A rapamicina induziu paragem do ciclo celular na fase G0/G1, mas não causou apoptose significativa das células mielomatosas

Para caracterizar o efeito inibidor do crescimento induzido pela rapamicina nas CM, as linhas celulares de MM mais sensíveis, OPM2 e MM1S, foram seleccionadas para quantificação da apoptose através da coloração com AV-APC/IP, e análise da distribuição nas fases do ciclo celular através da coloração do DNA com IP, conforme descrito em “Materiais e Métodos”.

O tratamento de células OPM2 com rapamicina a 50 nM durante 24 e 48 horas, causou um aumento ligeiro da fracção de células em apoptose precoce (AV-positivas/IP-negativas), respectivamente de 7% e 15%, em relação ao valor da apoptose basal (21%). Pelo contrário, a mesma concentração de rapamicina não causou apoptose nas células MM1S tratadas pelos mesmos períodos de tempo. O valor mais elevado da apoptose basal (33%) verificado para as células MM1S, pode ser explicado por uma maior sensibilidade desta linha celular à manipulação imposta pela técnica (figura 7).

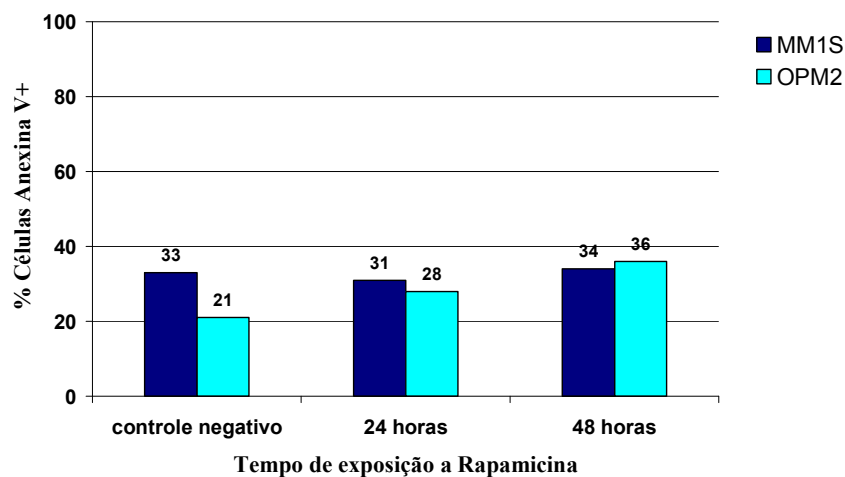
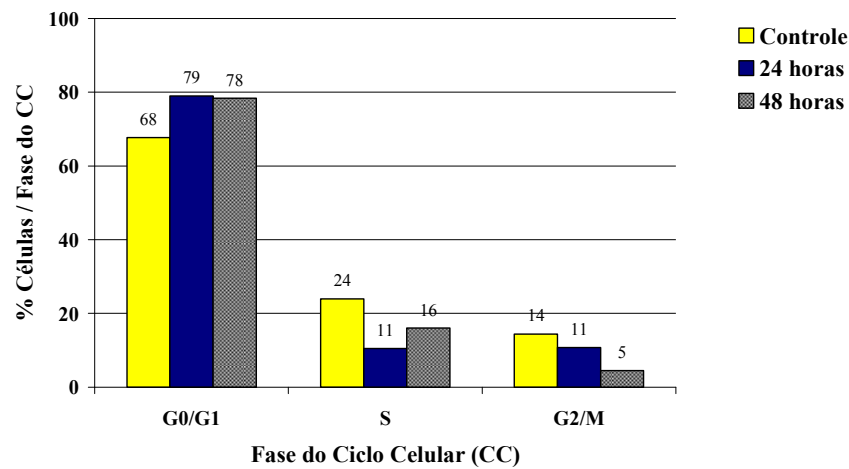


Figura 7 – Efeito apoptótico da rapamicina em linhas celulares de MM. As linhas celulares MM1S e OPM2 foram tratadas com rapamicina 50 nM durante 24 e 48 horas. A fracção de células em apoptose precoce (AV-positivas/IP-negativas) foi medida por citometria de fluxo com recurso à coloração com AV-APC/PI, e expressa como percentagem dum total de 20 mil células por cada condição da experiência. As fracções de células viáveis (AV-negativas/IP-negativas), células necróticas (AV-negativas/IP-positivas) e células em apoptose tardia/necróticas (AV-positivas/IP-positivas) foram omitidas do gráfico com vista a facilitar a interpretação.

A



B

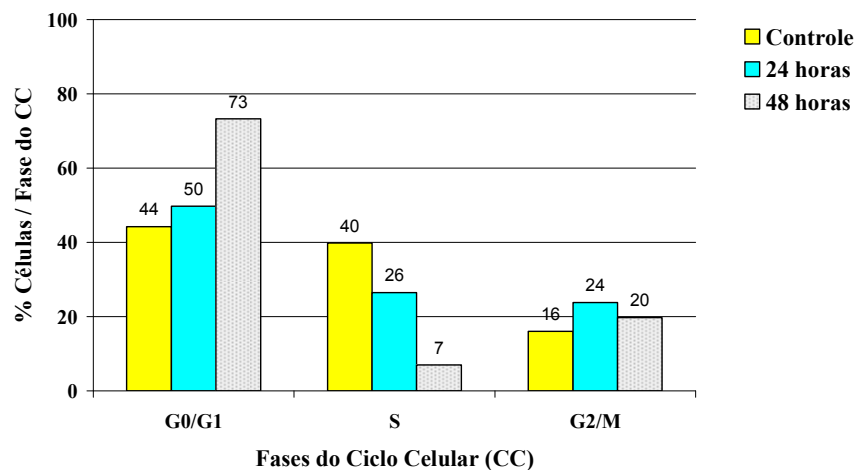


Figura 8 – Efeito da rapamicina na distribuição das fases do ciclo celular em linhas celulares de MM. As linhas celulares MM1S (A) e OPM2 (B) foram tratadas com rapamicina 50 nM durante 24 e 48 horas. As alterações na distribuição das fases do ciclo celular foram determinadas por quantificação do DNA nuclear corado com IP através de citometria de fluxo. A fração de células em cada fase do ciclo celular foi expressa como porcentagem do total de 20 mil células adquiridas por cada condição da experiência.

Em ambas as linhas celulares, MM1S e OPM2, o tratamento com rapamicina a 50 nM durante 24 e 48 horas induziu uma evidente paragem na fase G0/G1 do ciclo celular, efeito que foi mais marcado nas células OPM2, que apresentam maior velocidade de crescimento *in vitro* do que a das células MM1S (figura 8).

Concluimos que o efeito inibidor do crescimento causado pela rapamicina nas linhas celulares MM1S e OPM2 foi devido na (quase) totalidade à indução de paragem do ciclo celular, em vez de traduzir apoptose pelo fármaco.

O Apo2L/TRAIL induziu apoptose de linhas celulares de MM

Primeiro determinámos a sensibilidade de várias linhas celulares de MM: MM1S, MM1R, U266, RPMI8226, OPM2 e MM144, ao Apo2L/TRAIL.⁶¹ Após tratamento com concentrações crescentes de Apo2L/TRAIL (10-200 ng/mL) durante 24 horas, a viabilidade celular foi quantificada através do ensaio de MTT.

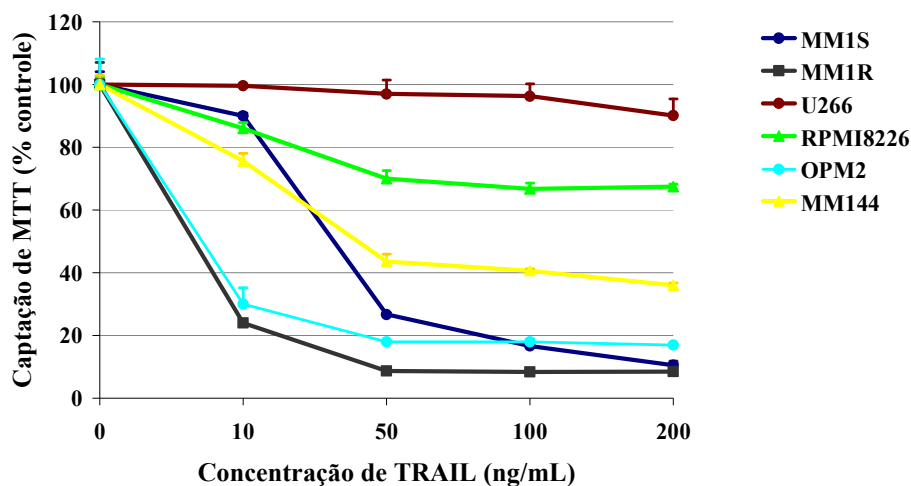


Figura 9 – Efeito do Apo2L/TRAIL na viabilidade de linhas celulares de MM. As linhas celulares MM1S, MM1R, U266, RPMI8226, OPM2 e MM144 foram incubadas com as concentrações indicadas de Apo2L/TRAIL, durante 24 horas. O número de células viáveis foi estimado pelo ensaio de MTT. Os resultados são a média \pm DP de 4 determinações para cada condição da experiência, expressos como percentagem dos valores correspondentes a células não-tratadas (controlo negativo).

O fármaco inibiu o crescimento celular de modo dependente da dose e distinguiram-se três níveis de sensibilidade das linhas celulares de MM. As linhas celulares mais sensíveis foram as MM1R, OPM2, MM1S e MM144, com inibições do crescimento entre

90% e 60% para uma concentração do fármaco de 100 ng/mL (figura 9). A linha celular RPMI8226 teve uma sensibilidade intermédia, com 33% de redução da viabilidade celular para uma concentração do fármaco de 100 ng/mL. A linha U266 foi resistente, mostrando um pequeno decréscimo da viabilidade (10%) para uma concentração de Apo2L/TRAIL de 200 ng/mL. A concentração de 200 ng/mL virtualmente não causou inibição adicional do crescimento nas outras linhas celulares.

Vários grupos de investigadores demonstraram que a indução da apoptose é o mecanismo através do qual o Apo2L/TRAIL inibe o crescimento celular.^{32,55,56,62,63}

A rapamicina protegeu as CM da apoptose induzida pelo Apo2L/TRAIL, quando usada em tratamento simultâneo e prévio

A extensa inibição do crescimento celular induzida pelo Apo2L/TRAIL nas linhas celulares que lhe foram sensíveis (MM1S, MM1R, OPM2, MM144), foi parcialmente revertido pelo tratamento simultâneo com rapamicina, conforme demonstrámos nos ensaios de MTT usando combinações dos dois fármacos em concentrações crescentes (figuras 10 e 11).

A protecção foi máxima na linha celular OPM2, a mais sensível à rapamicina, e maior para as combinações de rapamicina e Apo2L/TRAIL nas concentrações de 50 nM e 50 ng/mL, e de 100 nM e 100 ng/mL, respectivamente (figura 13). A protecção conferida pela rapamicina a 100 nM diminuiu substancialmente ao aumentarmos a concentração de Apo2L/TRAIL para 200 ng/mL, fármaco que, quando usado isoladamente nessa concentração, não induziu apoptose adicional significativa nas linhas celulares sensíveis.

Na linha celular RPMI8226 não observámos protecção pela rapamicina, porque estas células, ao serem pouco sensíveis tanto à rapamicina como ao Apo2L/TRAIL, deixaram uma escassa margem de inibição de crescimento (10%) susceptível de ser resgatada pela rapamicina a 100 nM, quando tratadas com TRAIL a 100 ng/mL (figura 12). A linha celular U266 foi resistente ao TRAIL.

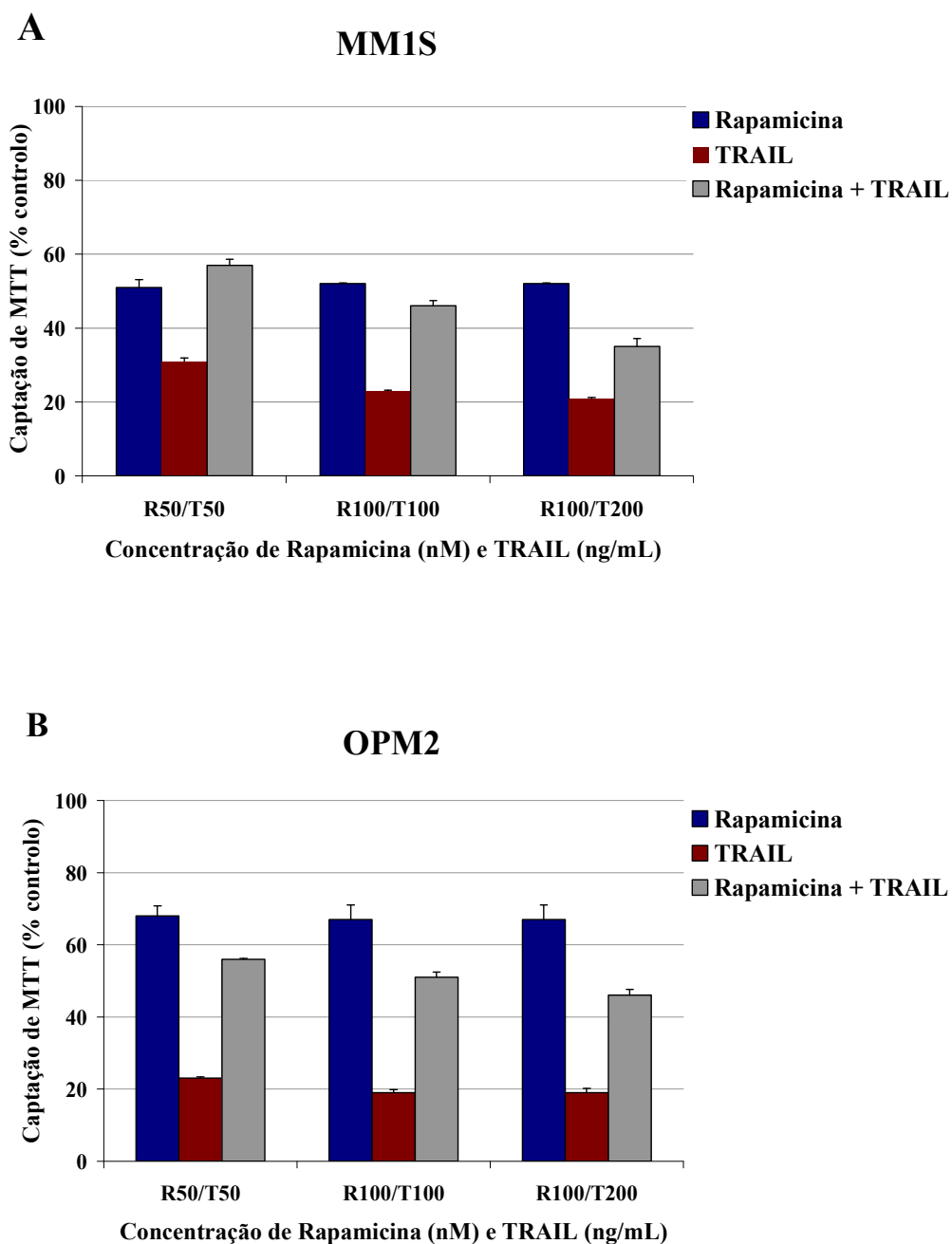


Figura 10 – Efeitos inibidores do crescimento da rapamicina e do TRAIL sobre linhas celulares de MM. Células das linhas MM1S (A) e OPM2 (B) foram tratadas com rapamicina, TRAIL, e a combinação de ambos, nas concentrações indicadas, durante 24 horas. A percentagem de células viáveis após tratamento foi determinada através do ensaio de MTT. Os resultados são a média \pm DP de 4 determinações para cada condição da experiência, expressos como percentagem dos valores correspondentes a células não-tratadas (controlo negativo).

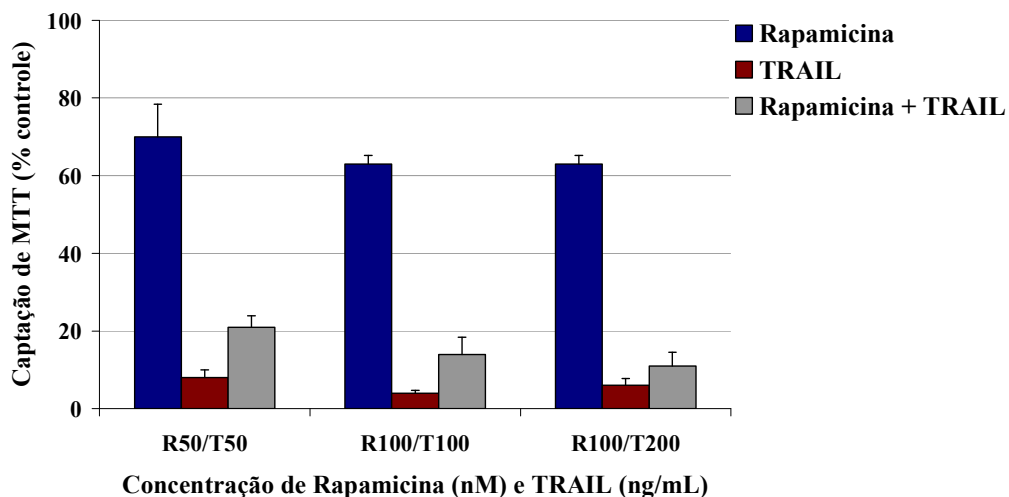
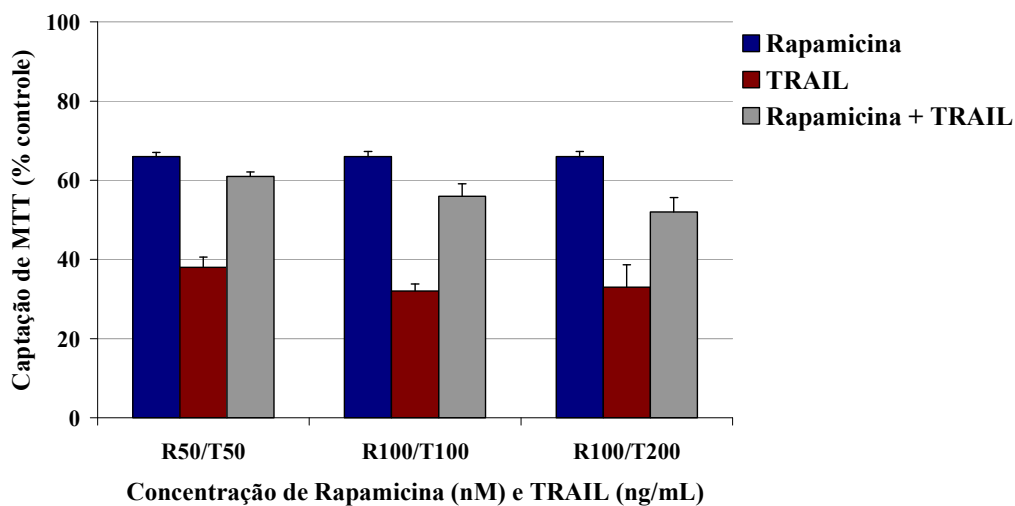
C**MM1R****D****MM144**

Figura 11 – Efeitos inibidores do crescimento da rapamicina e do TRAIL sobre linhas celulares de MM. Células das linhas MM1R (C) e MM144 (D) foram tratadas com rapamicina, TRAIL, e a combinação de ambos, nas concentrações indicadas, durante 24 horas. A percentagem de células viáveis após tratamento foi determinada através do ensaio de MTT. Os resultados são a média \pm DP de 4 determinações para cada condição da experiência, expressos como percentagem dos valores correspondentes a células não-tratadas (controlo negativo).

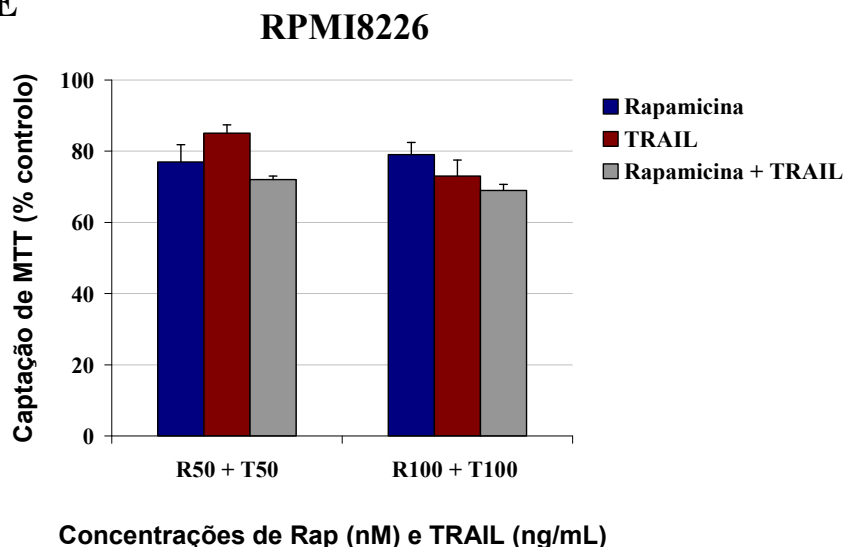
E

Figura 12 – Efeitos inibidores do crescimento da rapamicina e do TRAIL sobre linhas celulares de MM. Células da linha RPMI8226 (E) foram tratadas com rapamicina, TRAIL, e a combinação de ambos, nas concentrações indicadas, durante 24 horas. A percentagem de células viáveis após tratamento foi determinada através do ensaio de MTT. Os resultados são a média \pm DP de 4 determinações para cada condição da experiência, expressos como percentagem dos valores correspondentes a células não-tratadas (controlo negativo).

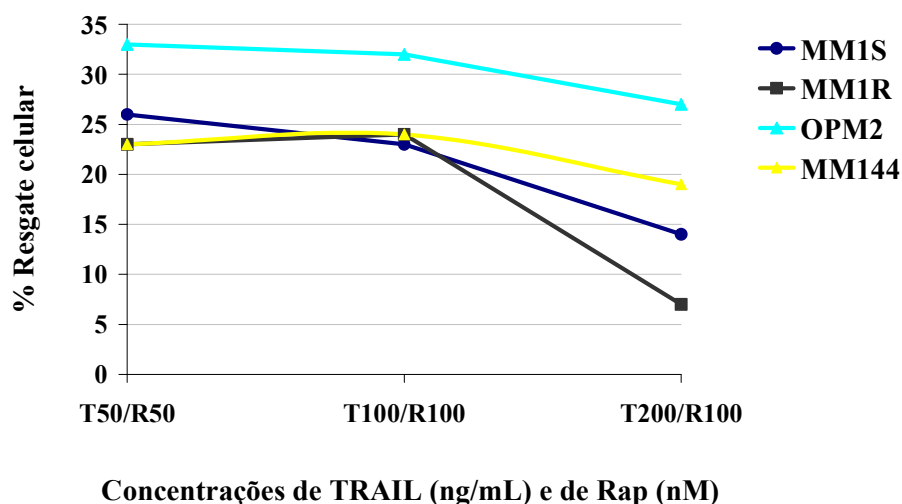


Figura 13 – Efeito de resgate da inibição do crescimento induzida por TRAIL obtido pelo tratamento combinado com rapamicina, nas linhas celulares de MM com maior sensibilidade ao TRAIL. As inibições do crescimento produzidas pelo tratamento, durante 24 horas, com rapamicina, TRAIL e a sua combinação nas concentrações indicadas, foram determinadas através de ensaio de MTT. A magnitude do resgate para cada combinação de concentrações dos fármacos, foi calculado subtraindo a percentagem células viáveis após tratamento com TRAIL isoladamente, à percentagem de células viáveis após tratamento com a combinação de dois fármacos.

Para confirmar que o efeito protector da rapamicina foi exercido ao nível da morte celular induzida pelo Apo2L/TRAIL, medimos a apoptose causada pelo tratamento das células MM1S com duas combinações de rapamicina e TRAIL em diferentes concentrações, durante 24 horas, através de citometria de fluxo das células coradas com AV-APC/IP. A rapamicina nas concentrações de 50 nM e 100 nM resgatou, respectivamente 37% e 48% das células da apoptose induzida por Apo2L/TRAIL nas doses de 50 ng/mL e 100 ng/mL (figura 14).

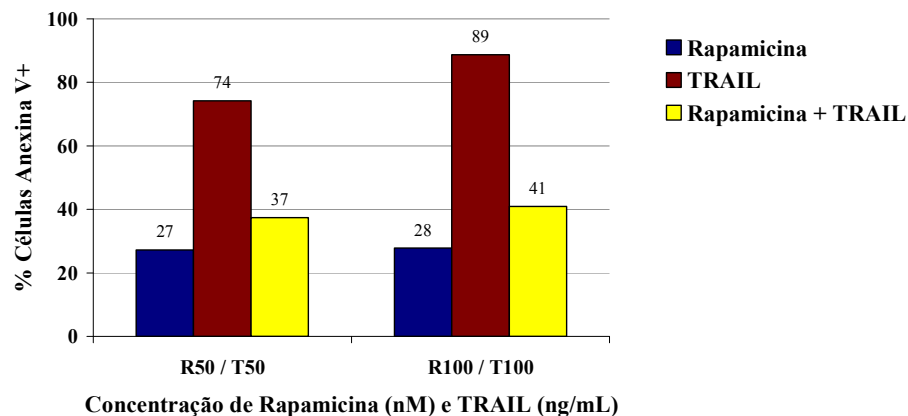


Figura 14 – Efeito de resgate celular da apoptose induzida por TRAIL, exercido pela rapamicina. Células MM1S foram tratadas com rapamicina, TRAIL e a combinação de ambos, nas concentrações indicadas, durante 24 horas. A extensão da apoptose em cada condição da experiência foi medida através de coloração com AV-APC/IP e citometria de fluxo. O número de células em apoptose precoce (AV-positivas e IP-negativas) foi expresso como percentagem do total de 20 mil células adquiridas por cada condição da experiência.

A nível da expressão proteica, estudada por *western blot*, a apoptose induzida pelo Apo2L/TRAIL nas células MM1S traduziu-se pela clivagem das caspases 8, 9 e 3, e do substrato das caspases, a PARP [poli(ADP-ribose) polimerase] (figuras 15 e 16). Detectámos clivagem a partir das 6 horas de tratamento com TRAIL, traduzida pela diminuição da largura das bandas dessas proteínas, embora fosse mais acentuada após 12 horas. A partir das 12 horas de exposição a Apo2L/TRAIL foi possível observar a banda correspondente à subunidade activa da caspase 8 (p18) e da caspase 3 (p17).

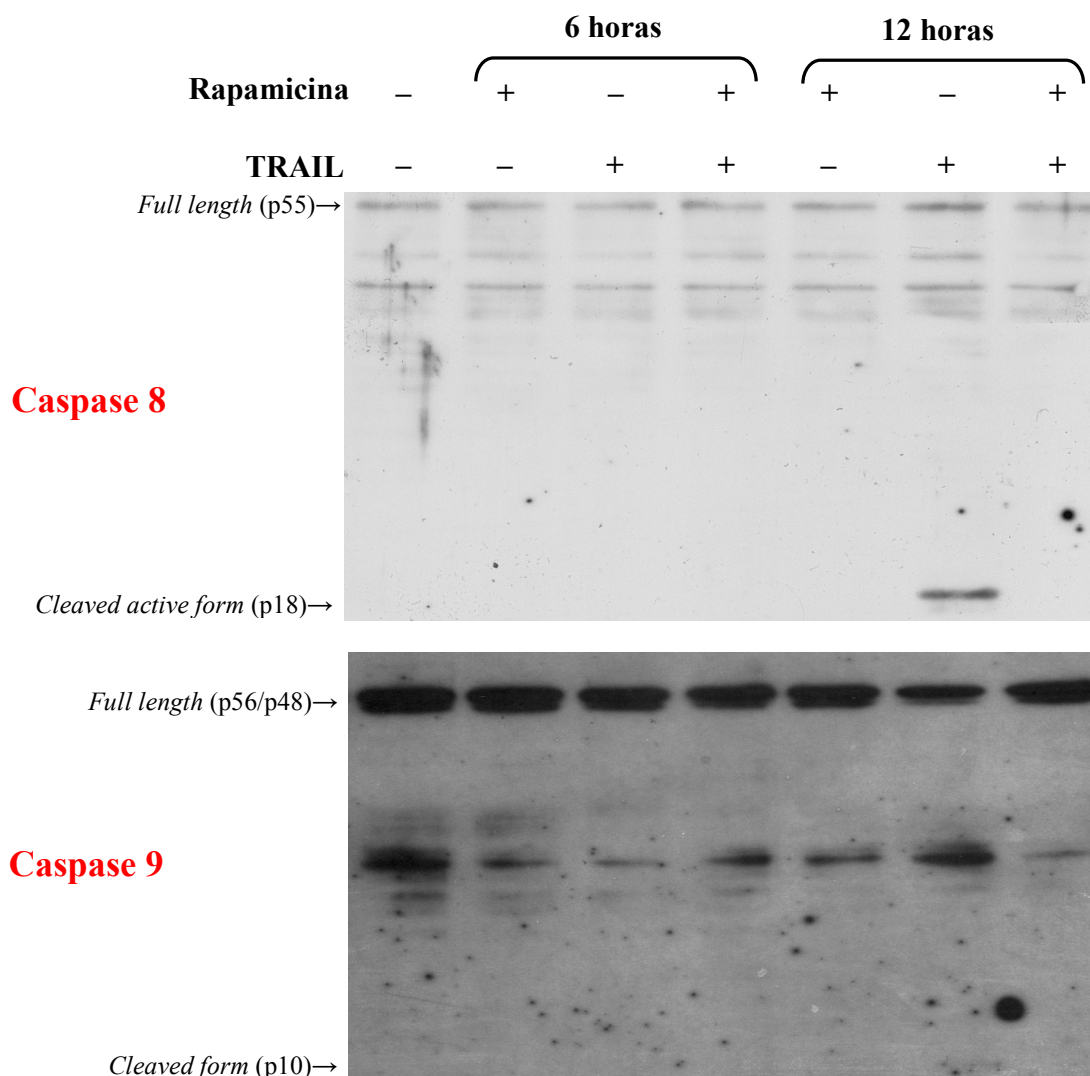


Figura 15 – Análise por *western blot* das caspases na linha celular MM1S tratada com rapamicina e/ou TRAIL. As células MM1S foram incubadas com rapamicina (100 nM), TRAIL (100 ng/mL) e a combinação de ambos nas mesmas concentrações, durante 6 e 12 horas. A exposição a TRAIL causou clivagem das caspases apicais 8 (via extrínseca) e 9 (via intrínseca), que se evidenciou pela diminuição da espessura das bandas das pró-caspases e pelo aparecimento das bandas proteicas das formas clivadas, mais visível a partir das 12H de tratamento. O resgate da apoptose induzida por TRAIL pela adição simultânea de rapamicina às culturas celulares, traduziu-se pela acentuação das bandas das pró-caspases e pelo desaparecimento das bandas proteicas das formas clivadas.

Corroborando os resultados obtidos nos ensaios de MTT e na medição da apoptose por citometria de fluxo, o tratamento simultâneo com rapamicina, protegeu parcialmente as células da apoptose induzida por TRAIL, conforme demonstrado pela atenuação/desaparecimento das bandas dos produtos de clivagem das caspases e da PARP, e pelo aumento da espessura das bandas das pró-caspases e da PARP.

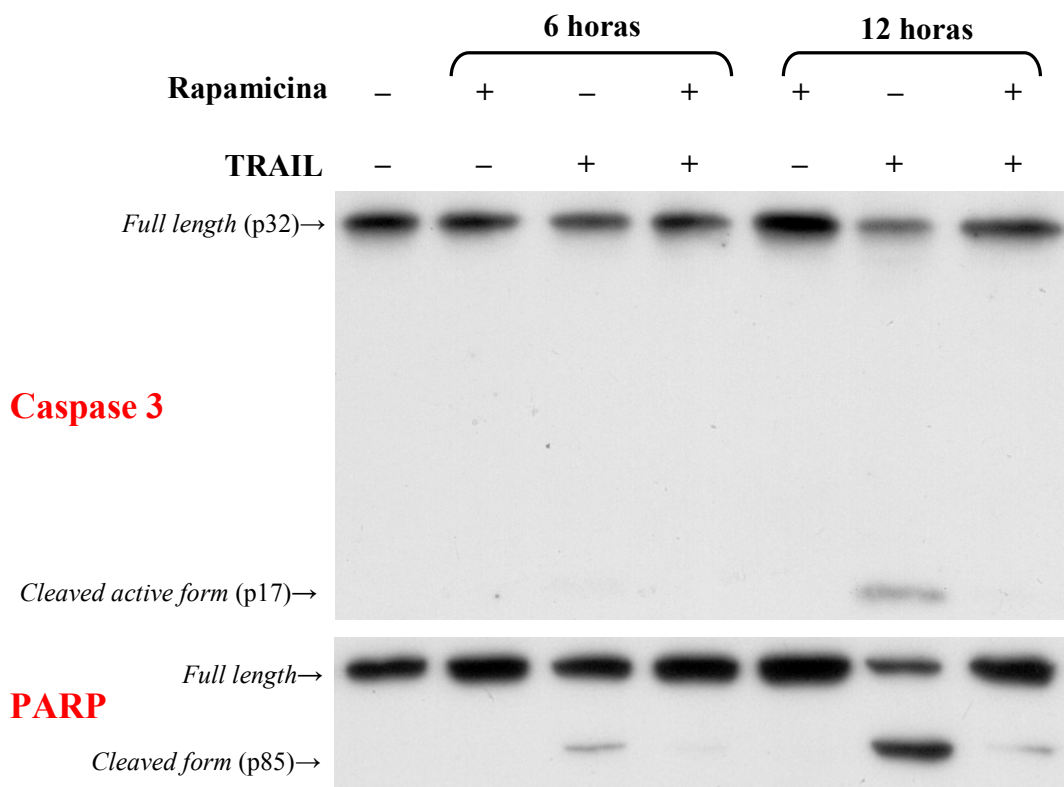


Figura 16 - Análise por western blot da caspase 3 e do PARP, na linha celular MM1S tratada com rapamicina e/ou TRAIL. As células MM1S foram incubadas com rapamicina (100 nM), TRAIL (100 ng/mL) e a combinação de ambos os fármacos nas mesmas concentrações, durante 6 e 12 horas. A exposição a TRAIL causou clivagem da caspase efetora 3 e do PARP, evidenciadas pela diminuição da espessura das bandas da pró-caspase 3 e do PARP, e pelo aparecimento das bandas proteicas das formas clivadas da caspase 3 e do PARP. O resgate da apoptose pela rapamicina, quando incubada simultaneamente com TRAIL, traduziu-se pelo aumento da espessura das bandas da pró-caspase 3 e do PARP, e pelo (quase) desaparecimento das bandas proteicas das formas clivadas de ambos.

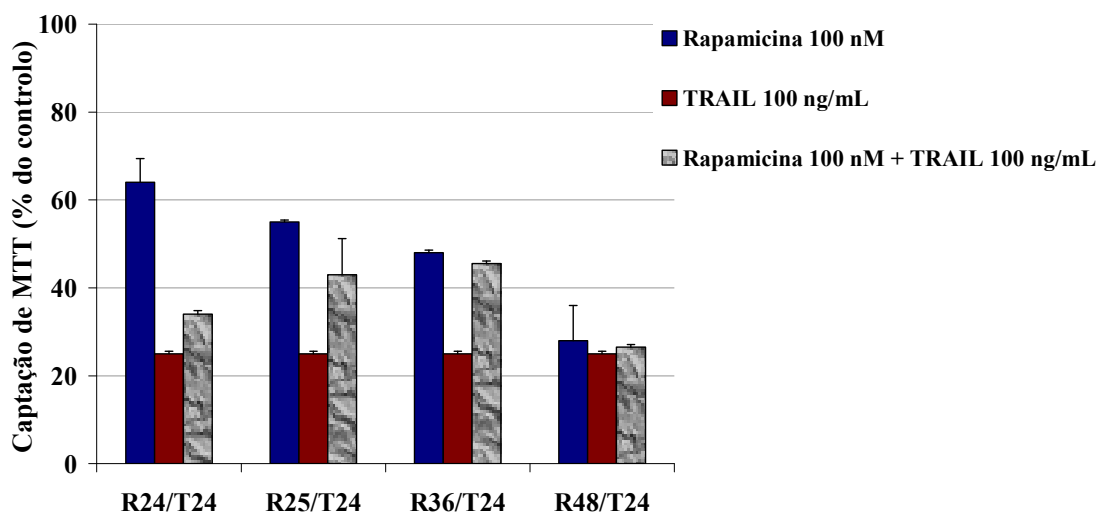
Tanto a caspase 8 como a 10 podem ser recrutadas para o complexo DISC da via de sinalização de morte celular do TRAIL, mas a caspase 8 parece ser a caspase apical essencial em CM, nomeadamente na linha celular MM1S, pois foi demonstrado que a caspase 10 não sofre clivagem proteolítica quando essas células são tratadas com TRAIL,⁵⁵ razão pela qual dispensámos a sua análise por *western blot*.

Para além da caspase 3, outras caspases efectoras, nomeadamente a 6, parecem ser directamente clivadas pela caspase 8 activada.⁵⁵ Perante este cenário de sobreposição de activação de caspases efectoras, funcionalmente redundantes, decidimos testar unicamente a caspase 3, por ser a principal caspase efectora da via extrínseca da apoptose.

Durante a apoptose induzida por TRAIL, ocorreu activação da via mitocondrial da apoptose, embora a clivagem da caspase 9 tenha sido discreta, perceptível unicamente por diminuição da espessura da banda proteica da pró-enzima após 12 horas de tratamento, conforme se pode observar no *western blot* da figura 15. Estes resultados sugerem que, nas CM, a caspase 9 tenha uma função redundante na apoptose induzida pelo TRAIL. Outros investigadores demonstraram que o pré-tratamento das células MM1S com LEDH-FMK (inibidor da caspase 9) não conferiu qualquer protecção da apoptose induzida pelo TRAIL.⁵⁵

A máxima protecção da apoptose induzida por Apo2L/TRAIL, foi conseguida quando as células MM1S foram pré-tratadas com rapamicina (100 nM) durante 12 horas, antes da adição de Apo2L/TRAIL (100 ng/mL), conforme podemos observar no ensaio de MTT da figura 17A. O efeito protector diminuiu substancialmente quando o tratamento com rapamicina foi iniciado com uma antecipação de 24 horas em relação à adição de TRAIL, porque a exposição das células MM1S a rapamicina na concentração de 100 nM durante 48 horas induz, por si só, acentuada inibição do crescimento. A protecção da apoptose induzida por Apo2L/TRAIL, ainda esteve presente quando as células MM1S foram incubadas com os dois fármacos simultaneamente, mas desapareceu quando a rapamicina (50 nM) foi adicionada às culturas depois do TRAIL (50 ng/mL). A pré-exposição a TRAIL, ainda que por uns escassos 60 minutos, anulou qualquer efeito de resgate da

A



B

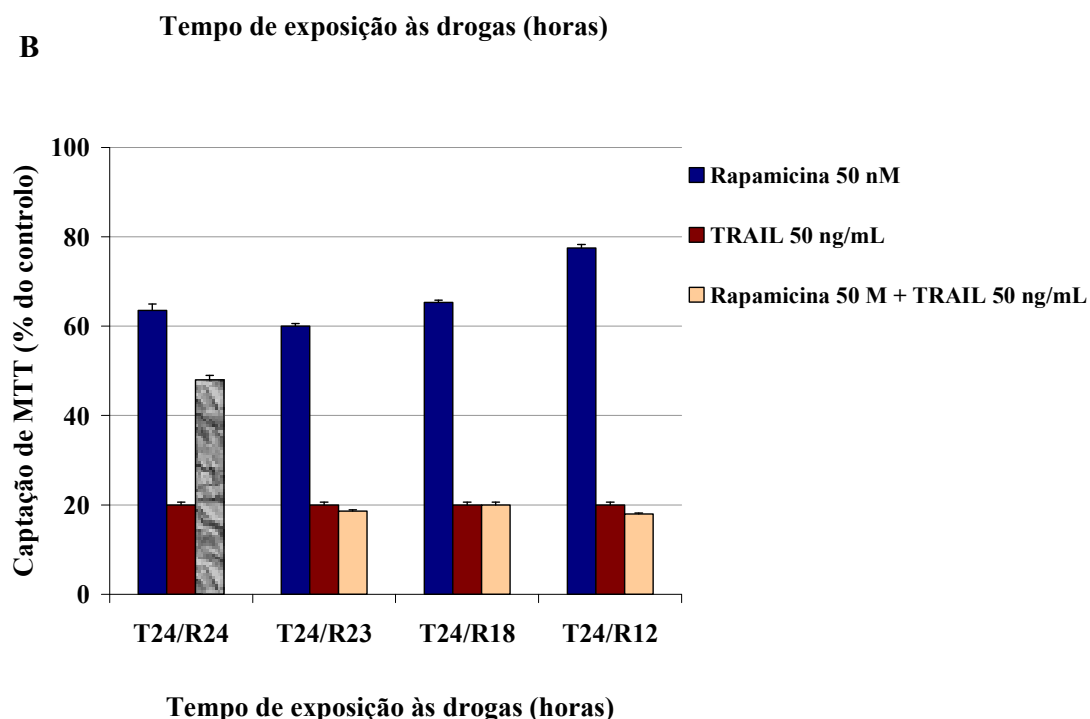


Figura 17 – Efeito de resgate da inibição do crescimento induzida por TRAIL, obtido pelo tratamento combinado de células MM1S com rapamicina. (A) Células MM1S foram incubadas com rapamicina (100 nM) e TRAIL (100 ng/mL) simultaneamente durante 24 horas (R24/T24), e pré-incubadas com rapamicina na mesma concentração durante 1 hora (R25/T24), 12 horas (R36/T24) e 24 horas (R48/T24). **(B)** Células MM1S foram incubadas com TRAIL (50 ng/mL) durante 24 horas, sendo a rapamicina (50 nM) adicionada simultaneamente (T24/R24), e passada(s) 1 hora (T24/R23), 6 horas (T24/R18) e 12 horas (T24/R12) de exposição ao TRAIL. Em cada agrupamento de colunas, estão incluídas condições em que as células foram tratadas com cada fármaco isoladamente pelos tempos indicados.

rapamicina sobre as células MM1S, como pode ser observado no ensaio de MTT da figura 17B.

Concluimos que a oportunidade da rapamicina proteger as CM da apoptose induzida por TRAIL perdeu-se quando permitimos, que na sua ausência, o TRAIL se ligasse aos receptores de morte DR4 e DR5, e activasse de forma irreversível a cascata da apoptose. A existir uma interacção da via PI3-K/Akt/mTOR com a via extrínseca da apoptose, esta seria mais ou menos directa, porque o efeito protector da rapamicina estabeleceu-se muito rapidamente, afastando a hipótese de ser mediado por alterações da transcrição de genes e/ou da transdução proteica.

A rapamicina não protegeu as CM da apoptose induzida pelo MegaFasL

Para saber se a protecção da rapamicina era extensível à apoptose induzida por agonistas de outros receptores de morte expressos à superfície das CM, testámos se o FasL e MegaFasL inibiam o crescimento das células MM1S, e se a rapamicina antagonizava esse efeito.

As células MM1S foram completamente resistentes à apoptose induzida pelo FasL, um agonista do receptor Fas, quando incubadas com concentrações entre 5-20 ng/mL durante 24 horas (figura 18).

O MegaFasL, uma forma hexamérica solúvel do FasL, é um agonista dos receptores de morte Fas, que induz extensa apoptose mediada pela activação da via dos receptores de morte, em linhas celulares de MM (ARH-77, RPMI8226, U266) e em CM primárias, que se correlaciona com os níveis de expressão de Fas à superfície celular.⁶⁴

A rapamicina a 50 nM foi incapaz de proteger as células MM1S da inibição do crescimento induzida pelo tratamento simultâneo com o MegaFasL nas concentrações de 10 e 50 ng/mL, durante 24 horas (figura 20).

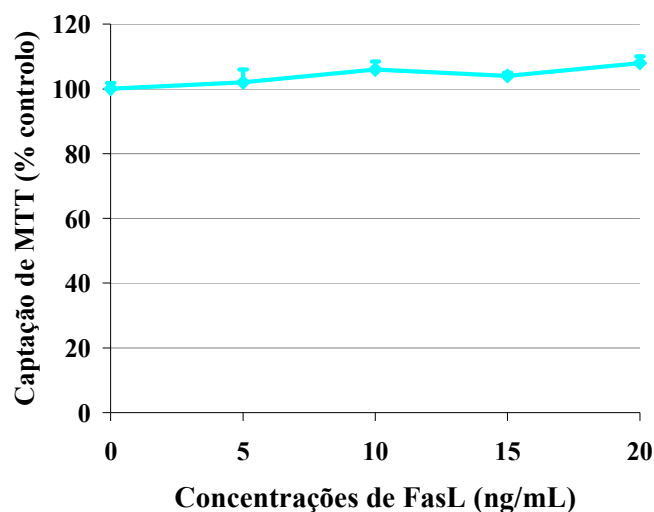


Figura 18 - Efeito do FasL na viabilidade da linha celular MM1S. Células MM1S foram incubadas com concentrações crescentes de FasL, durante 24 horas. O número de células viáveis foi estimado pelo ensaio de MTT. Os resultados são a média \pm DP de 4 determinações para cada condição da experiência, expressos como porcentagem dos valores correspondentes a células não-tratadas (controle negativo).

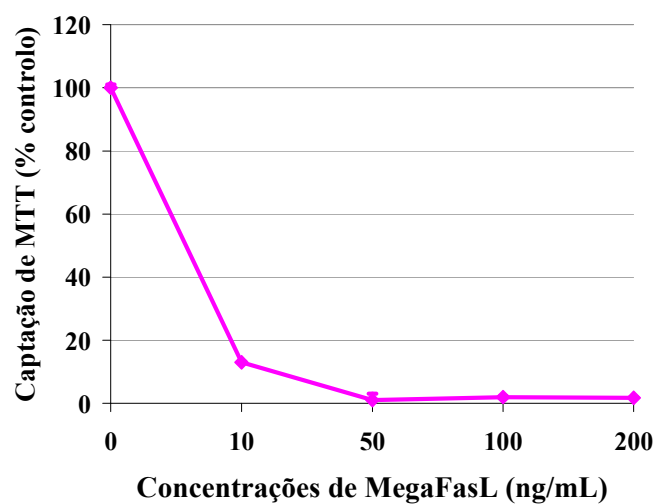


Figura 19 - Efeito do MegaFasL na viabilidade da linha celular MM1S. Células MM1S foram incubadas com concentrações crescentes de MegaFasL, durante 24 horas. O número de células viáveis foi estimado pelo ensaio de MTT. Os resultados são a média \pm DP de 4 determinações para cada condição da experiência, expressos como porcentagem dos valores correspondentes a células não-tratadas (controle negativo).

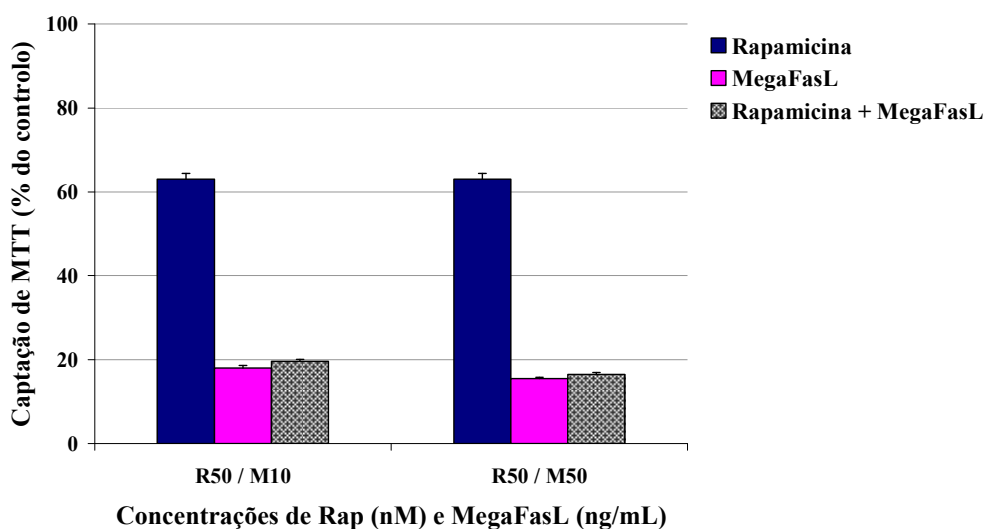


Figura 20 – Efeitos inibidores do crescimento da rapamicina e do MegaFasL sobre linhas celulares de MM. Células da linha MM1S foram tratadas com rapamicina, MegaFasL e a combinação de ambos, nas concentrações indicadas, durante 24 horas. A percentagem de células viáveis após tratamento foi determinada através do ensaio de MTT. Os resultados são a média \pm DP de 4 determinações para cada condição da experiência, expressos como percentagem dos valores correspondentes a células não-tratadas (controlo negativo).

Porque não reproduzimos o efeito protector da rapamicina para a apoptose induzida pelo MegaFasL, concluímos que a influência da via PI3-K/Akt/mTOR sobre a via extrínseca da apoptose, a existir, exercer-se-ia na sua porção mais apical, ao nível da expressão dos receptores de morte do TRAIL e/ou da constituição do DISC do TRAIL, porque a jusante da activação da caspase 8, a via extrínseca da apoptose é comum qualquer que seja o ligando de morte que a active (TNF- α , FasL, MegaFasL, TRAIL).

A rapamicina não afectou a expressão de mediadores da apoptose nas CM

A expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1 é fundamental para a

sobrevivência das CM, em particular o Mcl-1.⁶⁵ A expressão de Mcl-1 nas CM é regulada pela IL-6, em conjunto com a do Bcl-xL.

A depleção de Mcl-1 em células de linhas de MM (U266, OPM2, LP1) e em CM primárias, através de electroporação com oligonucleotídeo *antisense* específico, induziu apoptose significativa, ao contrário da depleção de Bcl-2 e Bcl-xL.⁶⁶ Noutro estudo, a expressão de Mcl-1 em plasmócitos mielomatosos e normais foi medida por citometria de fluxo após permeabilização celular e coloração com anticorpo monoclonal anti-Mcl-1-PE.⁶⁴ Cinquenta e dois por cento dos MM ao diagnóstico e 81% dos MM à recaída apresentaram sobreexpressão de Mcl-1 (> valor médio em plasmócitos normais + 2 desvios-padrão). O nível de expressão de Mcl-1 influenciou de modo desfavorável a sobrevivência livre de eventos.

Algumas linhas celulares de colangiocarcinoma humano (KMCH, KMBC e Witt) são resistentes à apoptose induzida por TRAIL, porque sobreexpressam Mcl-1.⁶⁷ A transfecção dessas linhas celulares com RNAsi Mcl-1 condicionou diminuição da expressão de Mcl-1 e aumento significativo da apoptose induzida por TRAIL.

As linhas celulares IM-9 (leucemia linfática crónica EBV+) ^{55,62} e HS-Sultan (MM) ⁵⁵ são resistentes à apoptose induzida pelo Apo2L/TRAIL, em parte, porque expressam baixos níveis intracelulares de caspase 8.

A rapamicina poderia causar alterações da expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas implicadas na sinalização via receptores de morte do TRAIL. Por isso, decidimos analisar a sua expressão nas células MM1S tratadas e não-tratadas com rapamicina, através de *western blot*.

As figuras 15, 16 e 21 mostram que o tratamento de células MM1S com rapamicina não diminuiu os níveis de expressão de pró-caspases 8, 9 e 3, nem aumentou os de Bcl2 e de Mcl-1, em comparação com os níveis observados em células não-tratadas da mesma linha de MM.

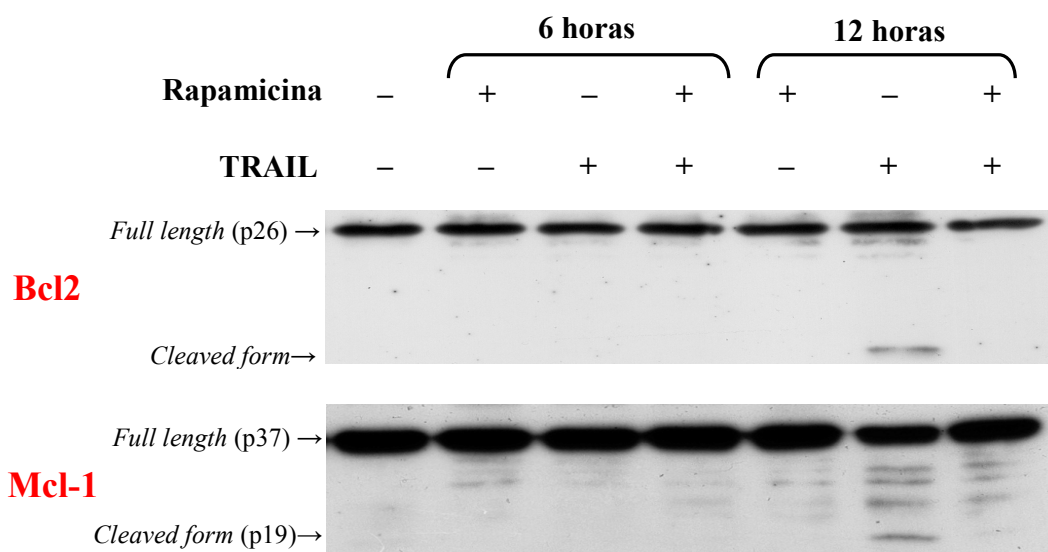


Figura 21 - Análise por *western blot* dos factores anti-apoptóticos da família Bcl-2, Bcl-2 e Mcl-1, em células MM1S tratada com rapamicina e/ou TRAIL. As células MM1S foram incubadas com rapamicina (100 nM), TRAIL (100 ng/mL) e a combinação de ambos nas mesmas concentrações, durante 6 e 12 horas. A exposição a TRAIL causou clivagem do Bcl-2 e do Mcl-1, mais evidentes após 12 horas de tratamento. O efeito de resgate da apoptose pela rapamicina, quando incubada simultaneamente com TRAIL, traduziu-se pelo aumento da espessura da banda proteica da forma intacta do Mcl-1, e pelo desaparecimento das bandas proteicas dos produtos de clivagem do Bcl-2 e do Mcl-1. A rapamicina não alterou os níveis de expressão de qualquer dos factores anti-apoptóticos, em comparação com os de células não-tratadas (controlo negativo).

A rapamicina não afectou o recrutamento do FADD e da pró-caspase 8 para o DISC induzido pela ligação do TRAIL aos seus receptores de morte, e tão-pouco diminuiu a clivagem da pró-caspase 8 ao nível do DISC

A formação do DISC é o passo inicial na via de sinalização da apoptose pelos receptores de morte do TRAIL. Os complexos triméricos TRAIL-DR4/DR5 recrutam FADD e pró-caspase 8, para formação do DISC.

Comparámos a constituição do DISC induzido pelo TRAIL, entre células MM1S tratadas e não-tratadas com rapamicina na concentração de 1000 nM durante 60 minutos. Numa condição da experiência, as células foram incubadas com 1 µg/mL de Bio-TRAIL durante 30 minutos, tempo em que ocorreu a formação do DISC do TRAIL. Noutra condição experimental, as células foram pré-tratadas com rapamicina a 1000 nM durante os primeiros 30 minutos, e coincubadas com Bio-TRAIL a 1 µg/mL nos 30 minutos subsequentes. Numa terceira condição (controlo negativo), as células não foram expostas a qualquer dos fármacos. Após lise das células, os complexos DISC foram precipitados com estreptavidina, eluídos e submetidos a SDS-PAGE. A presença de caspase 8 e FADD ao nível do DISC do TRAIL foi analisada por *western blot*, conforme descrito em “Materiais e Métodos”.

As quantidades de pró-caspase 8 e de FADD recrutados para o DISC induzido por TRAIL, não foram alteradas pelo pré-tratamento com rapamicina. A pró-caspase 8 (p55) sofreu clivagem ao nível do DISC, sendo visíveis as formas clivadas intermédias (p43/p41) no *western blot* da figura 22. A rapamicina não diminuiu a clivagem da pró-caspase 8 ao nível do DISC, pois a espessura das bandas p43 e p41 foi semelhante entre células tratadas e não-tratadas com rapamicina.

Concluimos que a rapamicina não bloqueou a formação do DISC nem a activação da caspase 8, pelo que o mecanismo implicado na protecção da apoptose induzida por TRAIL deve ser diverso.

A rapamicina diminuiu a expressão dos receptores DR4 e DR5 à superfície das CM, mas não a nível intracelular

À semelhança do verificado noutros tumores malignos, o padrão de expressão basal dos receptores do TRAIL, tanto dos receptores com domínio de morte intracelular (DR4, DR5), como dos chamados receptores *decoy* (DcR1, DcR2), não se correlacionou com a sensibilidade das CM à apoptose induzida por TRAIL, nem em linhas celulares de MM, incluindo a linha MM1S, nem em CM primárias de doentes.^{32,62,63}

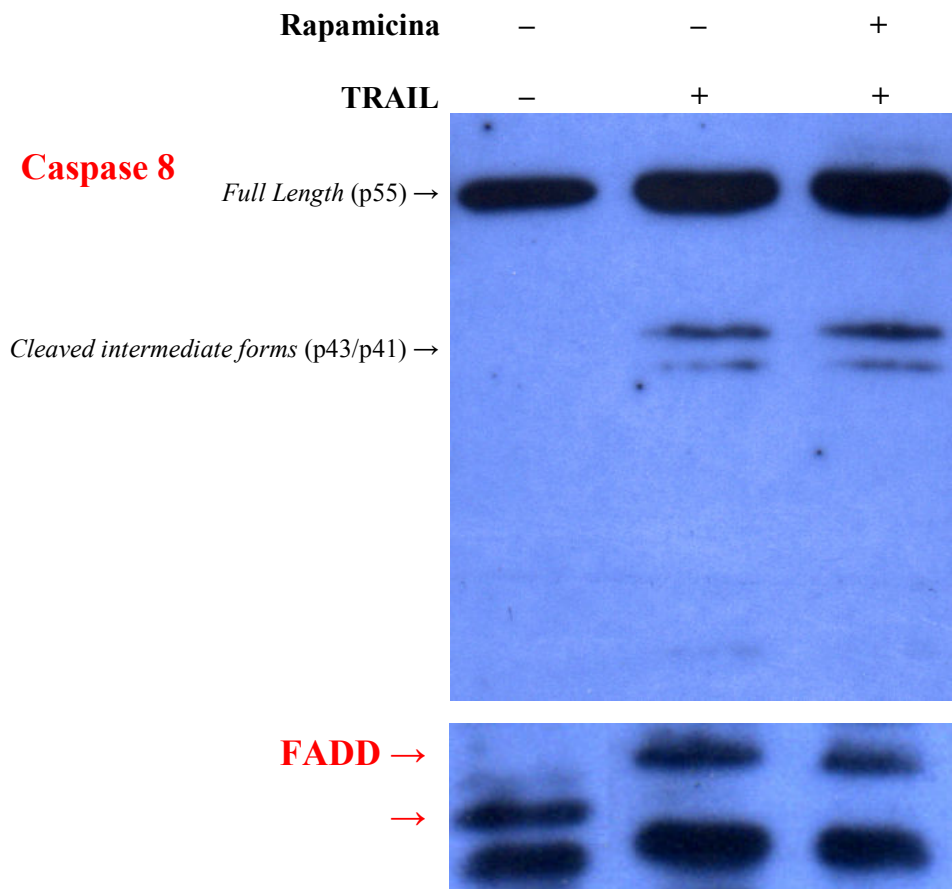


Figura 22 – Composição do DISC induzido pelo tratamento de células MM1S com TRAIL, isolado e em combinação com rapamicina. Células MM1S foram tratadas com Bio-TRAIL (1µg/mL) durante 30 minutos, isoladamente e após pré-tratamento com rapamicina (1000 nM) durante 30 minutos. O DISC foi precipitado com estreptavidina-agarose *overnight* a 4°C, sujeito a electroforese em gel de SDS-poliacrilamida e a *western blot*, para analisar a presença de pró-caspase 8 e de FADD, e a clivagem da caspase 8 ao nível do DISC.

Em determinadas linhas celulares de MM (ARH-77, IM-9) o receptor DR4 não foi detectado à superfície celular, embora tivesse expressão forte por *western blot*.³² Portanto, a expressão intracelular dos receptores de TRAIL nem sempre se traduz na sua expressão à superfície celular.

O pré-tratamento de células MM1S com doxorubicina sensibilizou-as para a apoptose induzida por TRAIL, efeito que foi atribuído ao aumento da expressão do receptor DR5,

verificado a nível intracelular por *western blot* e, à superfície celular por citometria de fluxo.³² Portanto, alterações da expressão dos receptores do TRAIL nas CM, induzidas pelo tratamento com certas fármacos, podem modular a sensibilidade ao TRAIL.

Estes achados levaram-nos a medir os níveis de expressão dos receptores de morte do TRAIL (DR4, DR5) a nível intracelular e à superfície de células MM1S tratadas com rapamicina a 50 nM, com TRAIL a 50 ng/mL e com a combinação dos dois fármacos nas mesmas concentrações, durante 12 horas, e compará-los com os níveis de expressão em células não-tratadas (controlo negativo).

O tratamento das células MM1S com rapamicina não diminuiu a expressão dos receptores DR4 e DR5, quando analisada por *western blot* (figura 23). Pelo contrário, as células MM1S que sobreviveram ao tratamento com TRAIL expressaram níveis mais baixos de ambos os receptores de morte do TRAIL, sobretudo do receptor DR5, achado já descrito por outros autores e que se deve à sobrevivência preferencial de células resistentes ao TRAIL.⁶²

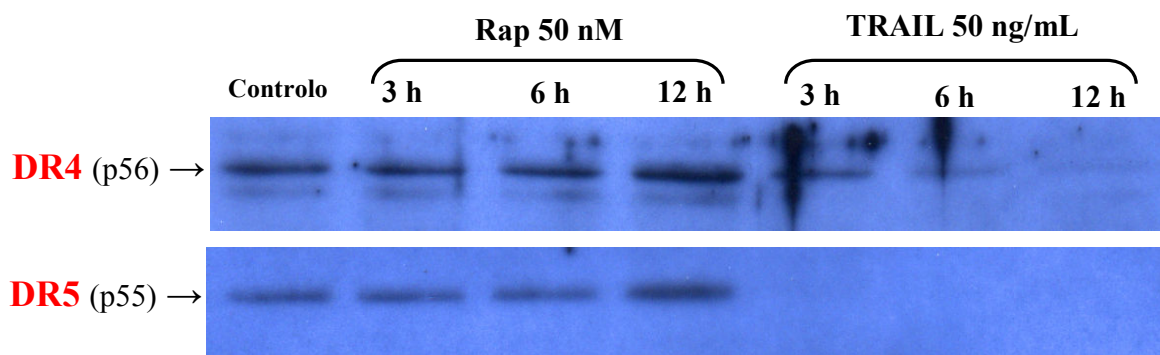


Figura 23 – Análise da expressão dos receptores de morte do Apo2L/TRAIL, por *western blot*, em células MM1S tratadas com rapamicina e com TRAIL. Células MM1S foram tratadas com rapamicina 50 nM e com TRAIL 50 ng/mL, durante os tempos indicados. Os níveis de expressão dos receptores DR4 e DR5 nas células tratadas com cada fármaco isoladamente foram comparados com os níveis basais presentes em células não-tratadas (controlo negativo).

Por citometria de fluxo após incubação das células com anticorpos monoclonais anti-DR4 e anti-DR5 marcados com PE, demonstrámos que a exposição a rapamicina, causou redução da expressão superficial de ambos os receptores do TRAIL, que foi muito mais marcada para o receptor DR4 (figura 24).

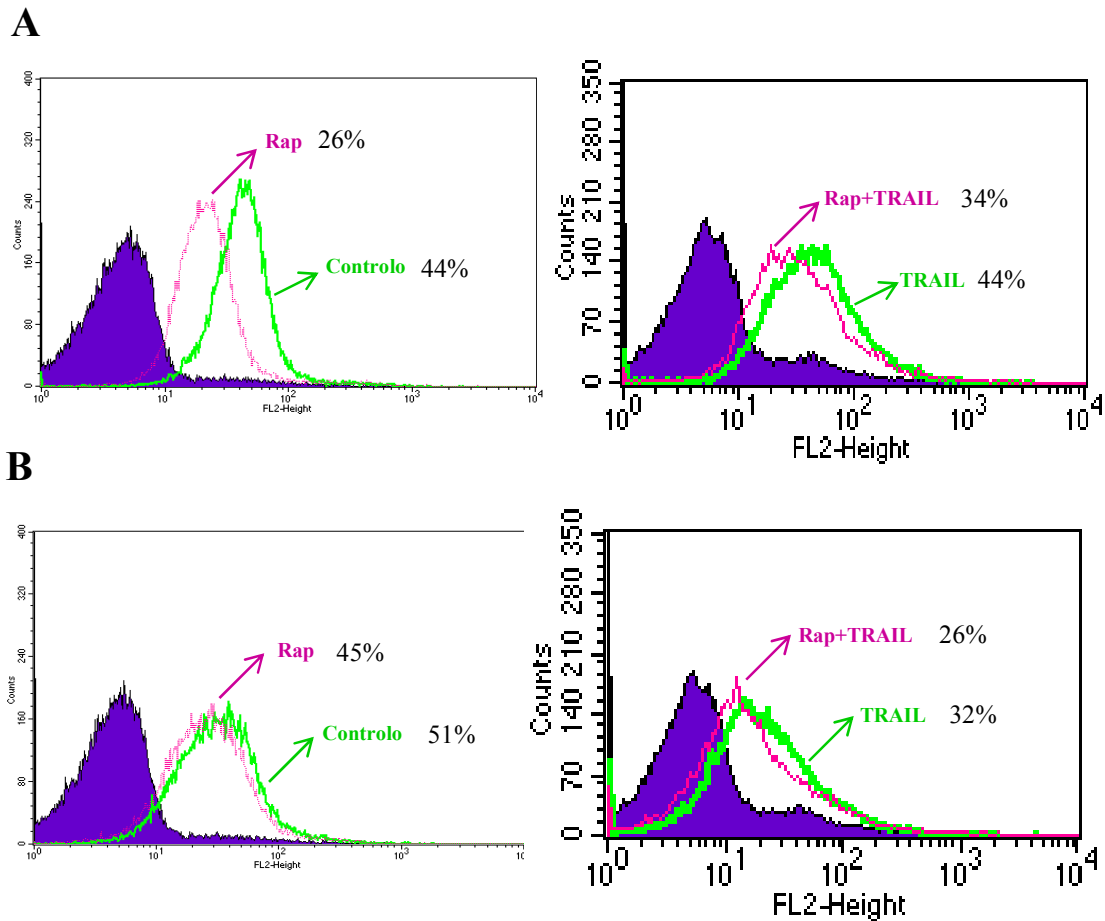


Figura 24 – Expressão dos receptores de Apo2L/TRAIL, DR4 (A) e DR5 (B), à superfície de células MM1S. As células foram tratadas com rapamicina 50 nM, TRAIL 50 ng/mL e a combinação dos dois fármacos, durante 12 horas, e depois incubadas com anticorpos monoclonais anti-DR4-PE (A), anti-DR5-PE (B). Foram feitos dois controlos negativos, constituídos por células cultivadas sem adição de fármacos. Um controlo negativo foi dividido em duas amostras que foram marcadas, respectivamente, com anti-DR4-PE e anti-DR5-PE (nos painéis esquerdos, assinalados com o rótulo controlo). Ao outro controlo negativo não foi adicionado qualquer anticorpo, e serviu como controlo isotípico (sombreado a violeta em todos os painéis). A ligação dos anticorpos foi analisada por citometria de fluxo, e é mostrada na forma de percentagem de células positivas em relação a um total de 30 mil células adquiridas, para cada condição da experiência.

Portanto, o tratamento com rapamicina apesar de não alterar o conteúdo celular total de receptores de morte do TRAIL, induz uma diminuição substancial da expressão do receptor DR4 à superfície das CM, efeito que pode explicar, pelo menos parcialmente, a protecção da apoptose conferida pela rapamicina, quando usada em pré- e co-tratamento com o TRAIL.

Por outro lado, nas células MM1S tratadas com TRAIL houve uma redução da expressão superficial do receptor DR5, resultado conciliável com o obtido por *western blot* em células tratadas da mesma forma, e que explicamos pela sobrevivência preferencial das células resistentes ao TRAIL, que não expressam receptor DR5.

DISCUSSÃO

No presente estudo, provámos que a rapamicina, um inibidor específico de mTOR, inibiu o crescimento *in vitro* de linhas celulares de MM (MM1S, MM1R, U266, RPMI8226, OPM2 e MM144), essencialmente através da indução de paragem do ciclo celular na fase G0/G1. Demonstrámos ainda que a rapamicina protegeu as CM sensíveis a Apo2L/TRAIL (MM1S, MM1R, OPM2 e MM144) da apoptose induzida pela interacção desse ligando de morte com os seus receptores funcionais à superfície celular, os receptores DR4 e DR5, efeito que não foi extensível ao MegaFasL, um agonista dos receptores de morte Fas. Finalmente, mostrámos que a rapamicina causou uma diminuição da expressão dos receptores de morte do TRAIL à superfície das células MM1S, sobretudo do receptor DR4, que pode explicar, pelo menos parcialmente, o efeito protector da rapamicina em relação à apoptose induzida por Apo2L/TRAIL em linhas celulares de MM sensíveis.

Strömberg e colaboradores⁴¹ trataram linhas celulares de MM (Karpas 707, U-1958, LP-1, RPMI8226, EJM e U266-1970) com rapamicina, que produziu inibições do crescimento *in vitro* dependentes da concentração do fármaco usada. As células RPMI8226 foram as menos sensíveis à rapamicina, evidenciando uma inibição do crescimento de 20% quando tratadas com rapamicina 20 nM durante 72 horas. No nosso estudo, as células RPMI8226 também foram as menos sensíveis, mas a incubação com rapamicina a 10 nM durante 48 horas produziu uma inibição do crescimento maior (30%). Em todas as linhas celulares estudadas, Strömberg⁴¹ demonstrou que a inibição do crescimento celular pela rapamicina foi devida, fundamentalmente, à paragem do ciclo celular na fase G0/G1, e não à indução de apoptose. No estudo por Yan e colaboradores,⁴⁴ a incubação de linhas celulares de MM (MM1S, OPM2 e RPMI8226) com rapamicina a 100 nM durante 48 horas, não induziu apoptose significativa, embora a análise do ciclo celular mostrasse causar eficazmente paragem na fase G0/G1. À semelhança destes autores, verificámos que a incubação de linhas celulares de MM com rapamicina a 50 nM até 48 horas: (a) não causou apoptose nas células MM1S e, que esta foi pouco significativa nas células OPM2 (15%); (b) aumentou significativamente a percentagem de células na fase G0/G1 do ciclo celular, de 68% para 78% na linha MM1S, e de 44% para 73% na linha OPM2. A linha celular OPM2 tem actividade cinase

da Akt aumentada, secundária à deleção de PTEN, que lhe confere maior sensibilidade à paragem do ciclo celular induzida pelos inibidores de mTOR.⁶⁸

Foi verificada grande variabilidade na sensibilidade de linhas celulares de diferentes tumores à inibição do crescimento pela rapamicina ou pelos seus análogos.^{36,38} Tumores que dependam, para o seu crescimento, da hiperactivação da via de sinalização PI3-K/Akt/mTOR, constitucional ou causada por estimulação parácrina/autócrina por citocinas, revelaram ser extremamente sensíveis à inibição do mTOR.

Gera e colaboradores⁶⁸ demonstraram que o nível de actividade da Akt determinou a sensibilidade de células de glioma à paragem na fase G1 do ciclo celular induzida pelo análogo da rapamicina CCI-779, tanto *in vitro* como *in vivo*, em células tumorais injectadas subcutaneamente em ratos NOD/SCID. A inibição do mTOR pelo CCI-779, causou uma alteração variável da transdução da ciclina D1 e do *c-myc*, dependendo do nível de actividade da Akt. Nas linhas celulares com hiperactividade da Akt, sensíveis à inibição do mTOR, a expressão de ciclina D1 e *c-myc* diminuíram significativamente, enquanto o contrário se verificou nas linhas celulares com baixa actividade da Akt, resistentes à inibição do mTOR. Os autores propuseram a seguinte explicação: a inibição de mTOR condiciona inibição da transdução *cap*-dependente da ciclina D1 e do *c-myc*, mas estes poderiam ser transduzidos alternativamente por um mecanismo *cap*-independente por conterem sequências IRES. A transdução IRES-dependente, um mecanismo de expressão proteica que evoluiu para manter a sobrevivência celular em ambientes privados de nutrientes, seria regulada pela Akt, sendo que altos níveis de actividade da Akt levariam à sua inibição. Portanto, em células tumorais com elevada actividade da Akt, esta inibiria o mecanismo IRES-dependente de transdução alternativa da ciclina D1 e do *c-myc*, causando paragem na fase G1 do ciclo celular. Em células com baixa actividade da Akt, esta não inibiria a transdução IRES-dependente, permitindo às células transitar para a fase S do ciclo celular.

A perda da expressão de PTEN em duas linhas celulares de MM, a OPM2 e a $\Delta 47$, é devida a deleção de parte do gene, incluindo o exão 4 onde se localiza o domínio fosfatase, o que explica o aumento da actividade da Akt, basal e após estimulação pelo

IGF-1.³⁹ A deleção de PTEN nas células OPM2 traduz-se em vantagem proliferativa e resistência relativa à apoptose induzida por dexametasona.⁶⁹

Num modelo murino de MM humano, o CCI-779 inibiu de forma mais significativa o crescimento de tumores subcutâneos compostos por células OPM2, que regrediram completamente, em comparação com os tumores de células RPMI8226, que mantiveram o mesmo volume no final do tratamento.⁴⁵ As maiores respostas dos tumores OPM2 correlacionaram-se com uma sensibilidade consideravelmente superior à inibição da proliferação e da angiogénese, e à indução de apoptose pelo fármaco, que os autores explicaram pela hiperactividade da Akt nas células OPM2, condicionada pela deleção do PTEN. A inibição da proliferação das células OPM2 pelo CCI-779 relacionou-se com diminuição da expressão da ciclina D1 e do *c-myc*, e com aumento da expressão do p27. Doses maiores de CCI-779 foram necessárias para produzir alterações similares na expressão da ciclina D1 e do p27 nas células RPMI8226, enquanto a expressão de *c-myc* aumentou de modo dependente da dose.

A identificação de marcadores biológicos tumorais de sensibilidade à inibição de mTOR é fundamental para a selecção de doentes que podem beneficiar do tratamento com rapamicina e análogos.^{38,40} Para além do PTEN, a perda da expressão do gene supressor tumoral VHL (Von Hippel-Lindau) também parece sensibilizar os tumores à inibição do mTOR.⁷⁰

Thomas e colaboradores⁷⁰ descobriram que nos casos de carcinoma renal com perda de expressão do gene VHL, as células tumorais eram particularmente sensíveis à inibição do crescimento pelo CCI-779. O gene VHL codifica uma E3 ligase responsável pela ubiquitinação da subunidade α da família de factores de transcrição HIF (*hypoxia-inducible factor*), marcando-os para posterior degradação pelo proteosoma. O HIF confere vantagem proliferativa e é suficiente para causar transformação maligna. A deleção/mutação do gene VHL leva a aumento dos níveis de HIF. A transdução de HIF-1 α e HIF-2 α depende de mTOR/S6K e da proteína ribossomal S6, pois os seus RNAm têm sequências 5'-TOP. Consequentemente, nas células tumorais deficientes em VHL, a inibição do mTOR anulou a expressão de HIF-1 α /2 α e diminuiu acentuadamente a sua proliferação.

O Apo2L/TRAIL inibiu a proliferação celular de linhas de MM e de CM primárias, de modo dependente da dose, efeito mediado pela indução de apoptose via receptores de morte.^{32,56,62,63} As linhas celulares sensíveis foram a MM1S,^{32,62} a MM1R³² (resistente a dexametasona), a ARP-1,³² a NCI-H929,⁶² a Dox6 e a Dox40³² (resistentes à doxorubicina), a LR5³² (resistente ao melfalam) e a MR20³² (resistente à mitoxantrona). No nosso estudo, as células MM1S e MM1R foram as mais sensíveis, apresentando inibições do crescimento de 92% e 83%, respectivamente, quando tratadas com Apo2L/TRAIL a 100 ng/mL durante 24 horas. As células RPMI8226 e U266 apresentaram sensibilidades variáveis conforme o estudo. Para Gómez-Benito e colaboradores,⁶² a linha celular RPMI8226 foi a linha de MM testada mais sensível, com cerca de 90% de redução do crescimento celular quando incubada com TRAIL a 100 ng/mL durante 22 horas, enquanto para Mitsiades e colaboradores,³² a inibição do crescimento foi de cerca de 40% nas mesmas condições de tratamento. Obtivemos uma sensibilidade menor das células RPMI8226 ao fármaco, com 33% de redução da viabilidade quando tratadas com uma concentração de 100 ng/mL durante 24 horas. A linha celular U266 foi resistente ao tratamento com TRAIL a 100 ng/mL, à semelhança do verificado em dois outros estudos,^{62,63} que documentaram menos de 5% de inibição do crescimento. Somente um estudo demonstrou sensibilidade das células U266 ao TRAIL.³² Após incubação com uma concentração do fármaco de 1000 ng/mL durante 24 horas, 83% das células localizaram-se na região sub-G1 (conteúdo de DNA subdiploide), por citometria de fluxo de células coradas com IP.

O FLIP é uma proteína celular expressa em duas isoformas por *splicing* alternativo: FLIP_S (28 kDa) e FLIP_L (55 kDa), que contêm dois domínios DED, através dos quais podem interagir com a FADD e a pró-caspase 8, causando bloqueio da ativação da caspase 8 ao nível do DISC. Kim e colaboradores⁷¹ demonstraram que a linha celular U266 hiperexpressava constitucionalmente FLIP_L, conforme traduzido pelo aparecimento duma banda proteica adicional de 43 kDa a nível do *western blot*, correspondente à forma truncada do FLIP_L, provavelmente responsável pelo bloqueio da sinalização Fas. Segundo os autores, a resistência das células U266 ao anticorpo agonista anti-Fas humano deveu-se à hiperexpressão do FLIP_L, que tem um efeito protector da apoptose mais potente que o FLIP_S.

Vários autores provaram que as CM primárias de doentes com MM e leucemia de plasmócitos são sensíveis à apoptose induzida por TRAIL *in vitro*.^{32,56,63} Gazitt e colaboradores⁵⁶ verificaram que a incubação de células CD38+CD45- purificadas a partir da fracção mononucleada da MO de seis doentes com uma concentração de LZ-TRAIL (forma *leucine zipper*) de 160 ng/mL durante 24 horas, causou um acréscimo da apoptose entre 59% e 81%, em relação ao valor basal. Lincz e colaboradores⁶³ ao tratarem as populações celulares mononucleares da MO de doentes com MM com LZ-TRAIL a 1000 ng/mL ou com S-TRAIL (forma solúvel) a 2000 ng/mL durante 24 horas, apenas obtiveram reduções significativas (20%-59%) das células CD138+ em 5/16 casos, salientando que a purificação das células CD38+CD45- a partir da fracção mononucleada da MO, pode sensibilizar as células para a apoptose induzida pelo tratamento subsequente com TRAIL.

Em ambos os estudos o TRAIL não teve efeito tóxico para as células CD34+^{56,63} e não inibiu a formação de colónias CFU-GM^{56,63} e BFU-E.⁵⁶ Num terceiro estudo, os linfócitos B normais, as células mononucleares da MO e do SP de dadores voluntários saudáveis, virtualmente não sofreram apoptose, quando expostas a doses de LZ-TRAIL até 1000 ng/mL durante 24 horas.³²

No nosso estudo, demonstrámos que a rapamicina protegeu as CM de linhas celulares sensíveis a Apo2L/TRAIL (MM1S, MM1R, OPM2 e MM144) da apoptose induzida por esse agonista dos receptores de morte, e procurámos caracterizar o mecanismo molecular subjacente a esse efeito da rapamicina.

À semelhança do verificado noutras linhas celulares tumorais (células T Jurkat, HCT116, CAMA-1 e HeLa),⁶⁰ o tratamento das células MM1S com TRAIL induziu degradação significativa do Mcl-1, que acompanhou a clivagem/activação das caspases 8 e 3. Embora o tratamento com TRAIL durante 12 horas tenha induzido alguma clivagem do Bcl-2, não foi perceptível diminuição no seu nível de expressão celular. Estes resultados sugerem que os níveis de expressão do Mcl-1, mais do que os do Bcl-2, sejam críticos para a sobrevivência de CM sensíveis a TRAIL. Não obstante, o mecanismo pelo qual a rapamicina protegeu as CM da apoptose induzida por TRAIL, não envolveu alterações na expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Mcl-1.

Na linha celular MM1S, sensível à apoptose induzida pelo Apo2L/TRAIL, a resistência adquirida através do cotratamento com rapamicina, não se deveu a aumento da expressão das caspase 8, 9 e 3 induzida pela inibição de mTOR.

A inibição da clivagem da pro-caspase 8 ao nível do DISC do TRAIL é um mecanismo major de resistência em CM. Dois inibidores da apoptose, o FLIP e o IAP-2, têm a capacidade de inibir a activação da caspase 8. A resistência das células IM-9 à apoptose induzida por TRAIL é devida, por um lado, à expressão de baixos níveis intracelulares de caspase 8, e por outro lado, à inibição da activação da caspase 8 pelo IAP-2 e pelo FLIP, o último encontrando-se sobreexpressado nesta linha celular.⁵⁵ A cicloheximida (CHX) é um inibidor da síntese proteica, que bloqueia a expressão de proteínas de semi-vida curta. Mitsiades e colaboradores,⁵⁵ demonstraram que o pré-tratamento das células IM-9 com CHX reverteu a resistência ao TRAIL, ao mesmo tempo que reduziu a expressão de IAP-2 e FLIP. Os autores também mostraram que a sensibilidade das células IM-9 à apoptose induzida por TRAIL era restaurada pela transfecção dum oligonucleotídeo *antisense* FLIP, e pelo tratamento com o SN50, um inibidor da translocação nuclear do NF-κB e da sua função activadora da transcrição, que causou uma diminuição da expressão de IAP-2.

Apesar da expressão de FLIP e IAP-2 nas células MM1S ser baixa,⁵⁵ não excluimos a possibilidade da rapamicina induzir resistência das CM ao Apo2L/TRAIL, através duma alteração da expressão desses inibidores da apoptose. Na experiência de precipitação do DISC, não detectámos diminuição da magnitude de activação da caspase 8 ao nível do DISC do TRAIL nas células pré-tratadas com rapamicina, o que sugere não existirem diferenças numa hipotética inibição da activação da caspase 8 por FLIP e/ou IAP-2 entre células tratadas e não-tratadas com rapamicina.

No nosso estudo, 44% das células MM1S expressaram receptor DR4 à superfície, em relação a 51% que expressaram receptor DR5, resultados que diferem um pouco dos descritos por outros autores, que encontraram uma expressão mais forte de DR4 do que de DR5 nas mesmas células, respectivamente de 63% e 33%.⁶² Esta disparidade pode dever-se a diferenças na afinidade dos anticorpos monoclonais anti-DR4 e anti-DR5 utilizados nos dois estudos. Os mesmos autores, notaram que o bloqueio dos receptores

DR4 de células MM1S com uma quimera DR4-Fc conferiu uma maior protecção da apoptose induzida por TRAIL, do que o bloqueio do receptor DR5 com a quimera correspondente. Extrapolando para o nosso estudo, concluímos que a diminuição da expressão do receptor DR4 à superfície de células MM1S condicionada pela rapamicina pode explicar, pelo menos parcialmente, a protecção da apoptose induzida pelo TRAIL.

No mesmo estudo, o pré-tratamento de células NCI-H929 com LY294002 (10 μ M), um inibidor da PI-3K, reduziu em cerca de 50% a apoptose induzida por TRAIL.⁶² Na mesma concentração, o LY294002 causou uma diminuição da expressão dos receptores DR4 à superfície das células NCI-H929, de 51% para 22%, e dos receptores DR5 de 18% para 5%. O pré-tratamento da mesma linha celular de MM com rapamicina a 100 nM durante 60 minutos, não produziu alteração na percentagem de apoptose induzida pela incubação com TRAIL a 100 ng/mL durante as 20 horas seguintes. Num ensaio de MTT, no qual coincubámos células NCI-H929 com as mesmas concentrações de rapamicina e de TRAIL durante 24 horas, obtivemos um resgate da inibição do crescimento de 19% (resultados não mostrados). Não obstante, os autores documentaram uma redução da expressão do receptor DR4 à superfície das células NCI-H929 tratadas com rapamicina na mesma concentração, enquanto a expressão do receptor DR5 não sofreu alteração. Estes dados, para além de suportarem que a inibição do mTOR condiciona resistência ao Apo2L/TRAIL em CM, revelam que esse efeito parece ser extensível à inibição da sinalização pela via PI-3K/Akt a montante de mTOR. Como a inibição do mTOR pela rapamicina também não potenciou a apoptose do MegaFasL, agonista do Fas, somos levados a concluir que o bloqueio de estímulos de sobrevivência originados na via PI-3K/Akt/mTOR não aumenta a extensão da apoptose das CM induzida pela activação da via dos receptores de morte.

Num estudo efectuado em linhas celulares de melanoma, sempre que o RNAm do receptor DR5 estava presente, as células expressaram o receptor à superfície celular.⁷² Pelo contrário, os receptores DR4 não foram detectados à superfície celular de algumas linhas celulares que continham o seu RNAm, o mesmo acontecendo aos receptores DcR1 e DcR2. Nas linhas com RNAm mas ausência de receptor detectável à superfície celular, a quantificação dos receptores DR4, DcR1 e DcR2 no citoplasma, por citometria de fluxo

após permeabilização celular, revelou estarem presentes em níveis significativos, sugerindo a existência de mecanismos de regulação pós-transducional, nomeadamente a translocação de receptores para a membrana plasmática e desta para o citoplasma.

Jin e colaboradores⁷³ estudaram o mecanismo de resistência ao TRAIL de clones de células SW480 (adenocarcinoma do cólon), produzidos por selecção através de tratamento prolongado com doses subletais do fármaco. Verificaram que a resistência era devida a uma diminuição da expressão do receptor DR4 à superfície celular, não acompanhada de alterações nos níveis intracelulares de RNAm e proteína DR4. Após excluírem a existência de uma mutação adquirida do receptor DR4 por sequenciação de DNA, de confirmarem que a transfecção com receptor DR4*wt* não aumentou a sua expressão à superfície celular, e de verificarem que o pré-tratamento com tunicamicina, um inibidor da glicosilação, ressensibilizou os clones SW480 ao TRAIL, ao mesmo tempo que aumentou significativamente a expressão do receptor DR4 à superfície celular, os autores concluíram que anomalia(s) das modificações pós-transducionais do receptor DR4 pode(m) prejudicar o transporte do receptor para a membrana plasmática.

Com base nestes achados, não podemos excluir a possibilidade da rapamicina interferir com a translocação dos receptores de morte do TRAIL para a membrana plasmática, por um mecanismo não claro.

O IGF-1, presente no soro e no microambiente medular de doentes com MM, pode conferir protecção às CM contra a apoptose induzida por TRAIL, através de estimulação das actividades da Akt e do NF-kB. Mitsiades e colaboradores,⁷⁴ verificaram que a pré-incubação de células MM1S com IGF-1 diminuiu significativamente a apoptose induzida por Apo2L/TRAIL. Pelo contrário, a pré-incubação com aIR-3, um anticorpo monoclonal anti-IGF-1R, que bloqueia a sinalização através do receptor de IGF-1, aumentou a sensibilidade das mesmas células para a apoptose induzida por Apo2L/TRAIL. Por outro lado, a incubação de células MM1S com IGF-1 (200 ng/mL) induziu rápida translocação nuclear da subunidade p50 do NF-kB e aumento significativo da sua actividade de ligação ao DNA. De modo inverso, a inibição da translocação nuclear do NF-kB, através do pré-tratamento com SN50, aumentou a apoptose induzida por TRAIL nas linhas

celulares sensíveis MM1S e RPMI8226, e reverteu a resistência ao fármaco das linhas celulares ARH-77 e IM-9.³² O tratamento das células MM1S com IL-6 (100 ng/mL) não as resgatou da apoptose induzida por TRAIL, assim como não estimulou a actividade do NF-κB.^{32,74} Os mesmos investigadores demonstraram que a estimulação das células MM1S pelo IGF-1 (200 ng/mL) causou uma activação da Akt mais intensa e prolongada, que a produzida pela IL-6 (50 ng/mL).⁷⁴ Do mesmo modo, a incubação com o IGF-1 condicionou inibição mais sustentada do FKHL-1 do que a IL-6, e aumentou a expressão dos inibidores da apoptose FLIP, c-IAP-2, XIAP, survivina e A1/bfl-1, enquanto a IL-6 aumentou a expressão unicamente da survivina. Por outro lado, a transfecção das células MM1S com um construto de Akt constitucionalmente activa protegeu-as da morte celular induzida pelo TRAIL. Resumindo, o efeito protector do IGF-1 contra a apoptose das CM induzida por Apo2L/TRAIL, parece ser mediado predominantemente pela activação da via PI3-K/Akt, que causa inibição sustentada do factor de transcrição pró-apoptótico FKHL-1 e aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas induzida pela activação do NF-κB.

Shi e colaboradores⁴³ demonstraram que a rapamicina aumentou a actividade Akt basal em várias linhas celulares de MM (MM1S, RPMI8226, OPM2, HS-Sultan) e em CM primárias, obtidas da MO de doentes. A pequena quantidade de IGF-I presente no soro activa a cascata PI3-K/Akt/mTOR e leva a fosforilação do IRS-1 pelo mTOR. O IRS-1 fosforilado dissocia-se dos receptores IGF-R e sofre degradação pelo proteosoma 26S. A alça de *feedback* negativo entre mTOR e IRS-1 contraria a sinalização basal IGF-I/IGF-R. Em condições basais de estimulação das CM por IGF-I (meio de cultura com 10% de soro fetal bovino), a rapamicina inibiu a fosforilação do IRS-1 e, conseqüentemente, aumentou a sua ligação aos receptores IGF-R, impedindo a sua degradação pelo proteosoma, efeitos que aumentaram a activação da PI-3K e da Akt a jusante. Como a activação da Akt pelo complexo Rictor/mTOR não é alterada pelo tratamento com rapamicina, o resultado final é um significativo aumento da activação da Akt e dos seus efeitos anti-apoptóticos. Os mesmos autores verificaram que a rapamicina protegeu as células OPM2 e RPMI8226 da apoptose induzida pelo bortezomib, achado que explicaram pela anulação do *feedback* negativo do mTOR sobre o IRS-1, que ao

permanecer ligado aos receptores IGF-R, manteve a sinalização através da via PI3-K/Akt.⁴³

Embora não tenhamos quantificado a actividade da Akt e do NF- κ B em CM tratadas e não-tratadas com rapamicina, julgamos possível que um aumento das suas actividades consequente à inibição de mTOR pela rapamicina, possa ter contribuído para a protecção da apoptose induzida pelo TRAIL nas linhas celulares de MM sensíveis (MM1S, MM1R, OPM2, MM144).

Os *rafts* lipídicos são microdomínios da membrana celular ricos em colesterol e esfingolípidos, que concentram proteínas específicas impedindo a sua livre difusão na membrana plasmática. A edelfosina e a perifosina, dois alquil-lisofosfolípidos (ALF's) sintéticos, induziram apoptose de CM de várias linhas celulares (MM1S, MM1R, RPMI8226, OPM2, MM144) e primárias de doentes.⁷⁵ O seu mecanismo de acção envolveu: (a) recrutamento e concentração de Fas, FADD e pró-caspase 8 em *rafts* lipídicos, que resultou na formação do DISC e na indução da apoptose independente do ligando; (b) potenciação da apoptose induzida por TRAIL ao recrutarem os receptores DR4 e DR5 para os *rafts* lipídicos; (c) indução da libertação de citocromo c pelas mitocôndrias e da apoptose pela via mitocondrial. A metil- β -ciclodextrina (MCD) e a filipina interferiram com a associação de proteínas aos *rafts* lipídicos, por causarem depleção e sequestração do colesterol respectivamente, e inibiram a apoptose induzida pela agregação do receptor Fas.

O resveratrol, um polifenol, induziu redistribuição dos receptores Fas, DR4 e DR5, do FADD e da pró-caspase 8 para os *rafts* lipídicos de células de linhas de carcinoma do cólon, facilitando a formação do DISC.⁷⁶ Deste modo, sensibilizou as células tumorais para a apoptose induzida pelo CH11 (anticorpo agonista anti-Fas) e pelo TRAIL. A nistatina, por causar sequestração do colesterol, suprimiu as alterações da composição dos *rafts* lipídicos induzidas pelo resveratrol e, consequentemente, reverteu a sensibilização aos agonistas dos receptores de morte.

No nosso estudo não excluimos a possibilidade da rapamicina interferir com a associação dos receptores de morte do TRAIL aos *rafts* lipídicos das CM, dificultando a formação

do DISC induzido pelo TRAIL. Não obstante, verificámos que o pré-tratamento de células MM1S com rapamicina, não diminuiu a formação do DISC induzido pelo TRAIL, nem a clivagem da caspase 8 ao nível do DISC.

Provámos que a rapamicina induziu uma diminuição da expressão dos receptores de morte do TRAIL à superfície das CM estudadas, sendo possível que a inibição do mTOR perturbe a translocação desses receptores para a membrana citoplasmática. Não obstante, mecanismos moleculares adicionais, que podem estar subjacentes ao efeito protector da rapamicina em relação à apoptose induzida pelo Apo2L/TRAIL, necessitam ser clarificados: (a) aumento das actividades da Akt e do NF- κ B, secundária à perda do *feedback* negativo do mTOR sobre a sinalização via IGF-1/IGF-1R, que podem reforçar a inibição de moléculas pró-apoptóticas (caspase 9, Bad, FKHR) pela Akt, e aumentar a expressão de citocinas (IL-6, VEGF, TNF- α) e de moléculas anti-apoptóticas (p.e IAP's, XIAP, Bcl-2, Bcl-xL), cuja transcrição é regulada pela actividade do NF- κ B; (b) interferência com a associação dos receptores de morte do TRAIL aos *rafts* lipídicos, dificultando a formação do DISC induzido pelo tratamento com TRAIL.

Demonstrámos, pela primeira vez, que a combinação da rapamicina com o Apo2L/TRAIL tem efeitos antagónicos sobre a viabilidade de CM *in vitro*, pelo que deve ser evitada no tratamento do MM em ensaios clínicos futuros.

RESUMO

RESUMO EM PORTUGUÊS

O mieloma múltiplo (MM) é a segunda neoplasia hematológica mais frequente. As remissões a longo prazo são raras, mesmo após quimioterapia em alta dose seguida de resgate com células progenitoras hematopoiéticas. Novas estratégias terapêuticas dirigidas a alvos moleculares são necessárias para melhorar o prognóstico uniformemente fatal desta doença. Os plasmócitos malignos são células com sobrevivência prolongada e baixo índice proliferativo, pelo que fármacos indutores de apoptose, como o TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), um agonista dos receptores de morte DR4 (*death receptor 4*) e DR5, poderia ser especialmente eficaz, sobretudo quando combinado com fármacos inibidores da via de sobrevivência e proliferação PI3-K/Akt/mTOR, como a rapamicina, um inibidor de mTOR (*mammalian target of rapamycin*).

A incubação com concentrações crescentes de rapamicina inibiu o crescimento *in vitro* de todas as linhas celulares de MM testadas (MM1S, MM1R, U266, RPMI8226, OPM2, MM144), essencialmente, através de indução de paragem do ciclo celular na fase G0/G1.

As linhas celulares MM1S, MM1R, OPM2 e MM144 apresentaram sensibilidades significativas à inibição do crescimento pelo tratamento *in vitro* com concentrações crescentes de TRAIL, enquanto a linha RPMI8226 teve sensibilidade intermédia e a linha U266 foi resistente. Vários grupos de investigadores demonstraram que o TRAIL inibe o crescimento de células mielomatosas através da indução de apoptose.

Nas linhas celulares mais sensíveis a TRAIL, a inibição do crescimento celular produzida pelo fármaco foi, parcialmente, revertida pela coincubação com rapamicina, efeito que traduz protecção da apoptose induzida pelo TRAIL, conforme demonstrámos para linha MM1S. O efeito protector da rapamicina não foi reproduzido para a inibição do crescimento celular induzida pelo MegaFasL, ligando de morte do receptor Fas, sugerindo que a inibição do mTOR tivesse repercussão ao nível da constituição do DISC do TRAIL e/ou da expressão dos receptores de morte do TRAIL.

Excluimos as possibilidades da rapamicina alterar: (a) a expressão das proteínas mediadoras da apoptose: caspases 8, 9 e 3, Bcl-2 e Mcl-1; (b) o recrutamento de FADD

e/ou pró-caspase 8 para o DISC do TRAIL; (c) a clivagem da pró-caspase 8 ao nível do DISC do TRAIL; (d) a expressão celular total dos receptores de morte do TRAIL, medida por *western blot*.

Finalmente, demonstrámos que a rapamicina causou uma diminuição da expressão dos receptores de morte do TRAIL à superfície das células MM1S, sobretudo do receptor DR4, quantificada por citometria de fluxo após marcação com anticorpos monoclonais anti-DR4 e anti-DR5, efeito que pode explicar, pelo menos parcialmente, a protecção conferida pela rapamicina contra a apoptose induzida pelo TRAIL em linhas celulares de MM sensíveis.

A rapamicina pode perturbar a translocação dos receptores de morte do TRAIL para a membrana citoplasmática, diminuindo a sua expressão à superfície de células mielomatosas. Não obstante, mecanismos moleculares adicionais podem ser responsáveis pelo efeito protector da rapamicina em relação à apoptose induzida pelo TRAIL: (a) aumento das actividades da Akt e do NF- κ B, secundária à inibição do mTOR, com consequente perda do *feedback* negativo do mTOR sobre a sinalização via IGF-1/IGF-1R, que pode reforçar a inibição de moléculas pró-apoptóticas (caspase 9, Bad, FKHR) pela Akt, e aumentar a expressão de citocinas (IL-6, VEGF, TNF- α) e de moléculas anti-apoptóticas (p.e IAP's, XIAP, Bcl-2, Bcl-xL), cuja transcrição é regulada pela actividade do NF- κ B; (b) interferência da rapamicina com a associação dos receptores de morte do TRAIL aos *rafts* lipídicos, dificultando a formação do DISC induzido pelo tratamento com TRAIL.

Demonstrámos, pela primeira vez, que a combinação da rapamicina com o TRAIL teve efeitos antagónicos sobre a viabilidade de CM *in vitro*, pelo que deve ser evitada no tratamento do MM em ensaios clínicos futuros.

ENGLISH SUMMARY

Multiple myeloma (MM) is the second most common hematologic malignancy. Long-lasting remissions are rare even in the setting of high-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation. Novel biologically based treatment strategies are needed to improve the uniformly fatal outcome of the disease. Malignant plasma cells are long-surviving cells with a low proliferation index, making apoptosis-inducing agents, such as TRAIL, a death receptor 4 and 5 (DR4 and DR5) agonist, a particularly attractive treatment. TRAIL combination with PI-3K/Akt/mTOR pathway inhibitors, like rapamycin, a specific mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitor, most probably would enhance its apoptotic effect, by blocking survival signaling.

MM cell incubation with increasing concentrations of rapamycin induced *in vitro* growth inhibition of all cell lines studied (MM1S, MM1R, U266, RPMI8226, OPM2 and MM144), which was mostly due to G0/G1 phase cell cycle arrest.

Among the MM cell lines tested, MM1S, MM1R, OPM2 and MM144 were the most sensitive to *in vitro* TRAIL-induced growth inhibition, while RPMI8226 cells had intermediary sensitivity and U266 cells were resistant. It has been extensively demonstrated that TRAIL reduces MM cell survival through apoptosis induction.

Rapamycin partially reversed TRAIL-induced growth inhibition of sensitive MM cell lines. This effect was explained by the rapamycin conferred protection against TRAIL-induced apoptosis, as we have proved for MM1S cell line.

MegaFasL is a Fas receptor death ligand, which causes extensive MM cell apoptosis *in vitro*. We could not reproduce the rapamycin protective effect against MegaFasL-induced growth inhibition in MM1S cell line. This finding suggested us the possibility that mTOR inhibition hampered TRAIL DISC formation and/or diminished TRAIL death receptor cell expression.

We have excluded that rapamycin MM cell treatment affected: (a) apoptosis-protein mediators expression: caspases 8, 9 and 3, and Bcl-2 and Mcl-1; (b) FADD and pro-

caspace 8 recruitment to TRAIL-induced DISC formation; (c) TRAIL death receptors cell expression, analyzed by western blot.

Noteworthy, MM1S cell treatment with rapamycin reduced TRAIL death receptors surface expression (mainly DR4 receptor), as measured by flow cytometric analysis after cell incubation with anti-DR4 and anti-DR5 monoclonal antibodies. This finding can partially explain rapamycin protective effect from TRAIL-induced apoptosis in MM sensitive cell lines. Rapamycin could possibly disturb TRAIL death receptor translocation to cytoplasmic cell membrane through an unknown mechanism.

Additional molecular mechanisms could underlie rapamycin protective effect: (a) Akt and NF- κ B activities enhancement, due to mTOR inhibition and consequent lost of the negative feedback on IGF-1/IGF-1R signaling, which could reinforce Akt-mediated pro-apoptotic protein mediators (caspase 9, Bad and FKHR) repression, and enhance NF- κ B-regulated transcription of cytokines (IL-6, VEGF, TNF- α) and anti-apoptotic inhibitors, such as IAP's, XIAP, Bcl-2 and Bcl-xL; (b) rapamycin interference in TRAIL death receptors recruitment and concentration into lipid *rafts*, hindering TRAIL-induced DISC formation.

Our study results demonstrated for the first time that rapamycin and TRAIL combination produced antagonistic effects on MM cell viability *in vitro*, and discourage its use for MM treatment in future clinical trials.

CURRICULUM VITAE

CURRICULUM VITAE

Patrícia Leonor Canas Guimarães, nasceu a 13 de Março de 1973 em Luanda, Angola.

Em 1988, foi aprovada no exame *First Certificate in English* do quinto ano do curso de Inglês do Instituto Britânico de Braga. Completou o ensino secundário na Escola Secundária Carlos Amarante em 1991.

Em 1993 ingressou no Curso de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa. Após aceitação da sua transferência para o Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, obteve a licenciatura em 2000.

Durante os dois anos subsequentes de Internato Geral, obteve experiência médica profissional no Hospital de S. Marcos, Braga. Em 2003 iniciou o Internato Complementar de Hematologia Clínica no Hospital de S. João, Porto, que concluirá na época de Janeiro/Fevereiro de 2008.

Em 2005 foi admitida no Mestrado de Medicina e Oncologia Moleculares da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, cuja tese de dissertação apresenta perante os magníficos jurados.

REFERÊNCIAS

1. Barlogie B, Shaughnessy J, Munshi N, Epstein J. Plasma cell myeloma. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, ed. Williams Hematology Sixth Edition. New York: McGraw-Hill, 2001: 1279-1304.
2. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. N Engl J Med. 2004; 351: 1860-1873.
3. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. N Engl J Med. 2003; 348: 1875-1883.
4. Attal M, Harousseau JL, Facon T, et al. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. N Engl J Med. 2003; 349: 2495-2502.
5. Cavo M, Tosi P, Zamagni E, et al. Prospective, randomized study of single compared with double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 Clinical Study. J Clin Oncol. 2007; 25: 2434-2441.
6. Rajkumar SV, Blood E, Vesole D, et al. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. J Clin Oncol. 2006; 24: 431-436.
7. Richardson P, Anderson K. Thalidomide and dexamethasone: a new standard of care for initial therapy in multiple myeloma. J Clin Oncol. 2006; 24: 334-336.
8. Cavo M, Zamagni E, Tosi P, et al. Superiority of thalidomide and dexamethasone over vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) as primary therapy in preparation for autologous transplantation for multiple myeloma. Blood. 2005; 106: 35-39.
9. Segeren CM, Sonneveld P, van der Holt B, et al. Vincristine, doxorubicin and dexamethasone (VAD) administered as rapid intravenous infusion for first-line treatment in untreated multiple myeloma. Br J Haematol. 1999; 105: 127-130.

10. Rajkumar SV, Hayman SR, Lacy MQ, et al. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood*. 2005; 106:4050-4053.
11. Attal M, Harousseau JL, Leyvraz S, et al. Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2006; 108: 3289-3294.
12. Barlogie B, Tricot G, Anaissie E, et al. Thalidomide and hematopoietic-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2006; 354: 1021-1029.
13. Davies FE, Forsyth PD, Rawstron AC, et al. The impact of attaining a minimal disease state after high-dose melphalan and autologous transplantation for multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2001; 112: 814-819.
14. Jagannath S, Durie BGM, Wolf J, et al. Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2005; 129: 776-783.
15. Harousseau JL, Attal M, Leleu X, et al. Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study. *Haematologica*. 2006; 91: 1498-1505.
16. Rosiñol L, Oriol A, Mateos MV, et al. Phase II Pethema trial of alternating bortezomib and dexamethasone as induction regimen before autologous stem-cell transplantation in younger patients with multiple myeloma: efficacy and clinical implications of tumor response kinetics. *J Clin Oncol*. 2007; 25 (published ahead of print).
17. Oakervee HE, Popat R, Curry N, et al. PAD combination therapy (PS-341/bortezomib, doxorubicin and dexamethasone) for previously untreated patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2005; 129: 755-762.

18. Wang M, Giralt S, Delasalle K, et al. Bortezomib in combination with thalidomide-dexamethasone for previously untreated multiple myeloma. *Hematology*. 2007; 12: 235-239.
19. Barlogie B, Anaissie E, van Rhee F, et al. Incorporating bortezomib into upfront treatment for multiple myeloma: early results of total therapy 3. *Br J Haematol*. 2007; 138: 176-185.
20. Sirohi B, Powles R. Multiple myeloma. *Lancet*. 2004; 363: 875-887.
21. Bruno B, Giaccone L, Rotta M, et al. Novel targeted drugs for the treatment of multiple myeloma: from bench to bedside. *Leukemia*. 2005; 19: 1729-1738.
22. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*. 2004; 104: 607-618.
23. Greenstein S, Krett NL, Kurosawa Y, et al. Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: A model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells. *Exp Hematol*. 2003; 31: 271-282.
24. Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, et al. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*. 2001; 20: 5991-6000.
25. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999; 96: 857-868.
26. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, et al. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & Dev*. 1998; 12: 3499-3511.

27. Qiang Y, Kopantzev E, Rudikoff S. Insulin-like growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. *Blood*. 2002; 99: 4138-4146.
28. Panwalkar A, Verstovsek S, Giles F. Nuclear Factor-KappaB modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies. *Cancer*. 2004; 100: 1578-1589.
29. Akiyama M, Hideshima T, Hayashi T, et al. Nuclear factor-kB p65 mediates Tumor necrosis factor α -induced nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein. *Cancer Res*. 2003; 63: 18-21.
30. Hinz M, Krappmann D, Eichten A, et al. NF-kB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*. 1999; 19: 2690-2698.
31. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Biologic sequelae of nuclear factor-kB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood*. 2002; 99: 4079-4086.
32. Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, et al. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood*. 2001; 98: 795-804.
33. Landowski TH, Olashaw NE, Agrawal D, et al. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kB (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene*. 2003; 22: 2417-2421.
34. Pene F, Claessens YE, Muller O, et al. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/p70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene*. 2002; 21: 6587-6597.
35. Hu L, Shi Y, Hsu J-H, et al. Downstream effectors of oncogenic *ras* in multiple myeloma cells. *Blood*. 2003; 101: 3126-3135.

36. Panwalkar A, Verstovsek S, Giles FJ. Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer*. 2004; 100: 657-666.
37. Petroulakis E, Mamane Y, Le Bacquer O, et al. mTor signaling: implications for cancer and anticancer therapy. *Br J Cancer*. 2006; 94: 195-199.
38. Xu G, Zhang W, Bertram P, et al. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-Akt-mTOR pathway in common human tumors. *Int J Oncol*. 2004; 24: 893-900.
39. Hyun T, Yam A, Pece S, et al. Loss of PTEN expression leading to high Akt activation in human multiple myeloma. *Blood*. 2000; 96: 3560-3568.
40. Sarbassov D, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR complex. *Science*. 2005; 307: 1098-1101.
41. Strömberg T, Dimberg A, Hammarberg A, et al. Rapamycin sensitizes multiple myeloma cells to apoptosis induced by dexamethasone. *Blood*. 2004; 103: 3138-3147.
42. Choo AY, Blenis J. TORgeting oncogene addiction for cancer therapy. *Cancer Cell*. 2006; 9: 77-79.
43. Shi Y, Yan H, Frost P, et al. Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the Akt kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol-3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther*. 2005; 10: 1533-1540.
44. Yan H, Frost P, Shi Y, et al. Mechanism by which mammalian target of rapamycin inhibitors sensitize multiple myeloma cells to dexamethasone-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2006; 66: 2305-2313.
45. Frost P, Moatamed F, Hoang B, et al. In vivo antitumor effects of the mTOR inhibitor CCI-779 against human multiple myeloma cells in a xenograft model. *Blood*. 2004; 104: 4181-4187.

46. Raje N, Kumar S, Hideshima T, et al. Combination of the mTOR inhibitor rapamycin and CC-5013 has synergistic activity in multiple myeloma. *Blood*. 2004; 104: 4188-4193.
47. Nagane M, Huang H-JS and Cavenee WK. The potential of TRAIL for chemotherapy. *Apoptosis*. 2001; 6: 191-197.
48. Ashkenazi A and Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281: 1305-1308.
49. Degli-Esposti M, Dougall WC, Smolak PJ, et al. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*. 1997; 7: 813-820.
50. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, et al. APO2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to Death Receptors 4 and 5. *Immunity*. 2000; 12: 611-620.
51. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, et al. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL Receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL Receptor 2. *Immunity*. 2000; 12: 599-609.
52. Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, et al. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kB pathway. *Immunity*. 1997; 7: 821-830.
53. Mérino D, Lalaoui N, Morizot A, et al. Differential inhibition of the TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 7046-7055.
54. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Dev*. 2001; 15: 2922-2933.

55. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human multiple myeloma cells. *Blood*. 2002; 99: 2162-2171.
56. Gazitt Y. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 1999; 13: 1817-1824.
57. Green DR and Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998; 281: 1309-1312.
58. Weng C, Li Y, Xu D, et al. Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells. *J Biol Chem*. 2005; 280: 10491-10500.
59. Clohessy JG, Zhuang J, de Boer J, et al. Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 2006; 281: 5750-5759.
60. Han J, Goldstein LA, Gastman BR, and al. Interrelated roles for Mcl-1 and Bim in regulation of TRAIL-mediated mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem*. 2006; 281: 10153-10163.
61. Drexler HG, Matsuo Y. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leukemia Res*. 2000; 24: 681-703.
62. Gómez-Benito M, Martínez-Lorenzo MJ, Anel A, et al. Membrane expression of DR4, DR5 and caspase-8 levels, but not Mcl-1, determine sensitivity of human myeloma cells to Apo2L/TRAIL. *Exp Cell Res*. 2007; 313: 2378-2388.
63. Lincz LF, Yeh T-X, Spencer A. TRAIL-induced eradication of primary tumor cells from multiple myeloma patient bone marrows is not related to TRAIL receptor expression or prior chemotherapy. *Leukemia*. 2001; 15: 1650-1657.

64. Greaney P, Nahimana A, Lagopoulos L, et al. A Fas agonist induces high levels of apoptosis in haematological malignancies. *Leuk Res.* 2006; 30: 415-426.
65. Wuillème-Toumi S, Robillard N, Gomez P, et al. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia.* 2005; 19: 1248-1252.
66. Derenne S, Monia B, Dean NM, et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-xL is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood.* 2002; 100: 194-199.
67. Taniai M, Grambihler A, Higuchi H, et al. Mcl-1 mediates Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 3517-3524.
68. Gera JF, Mellinghoff IK, Shi Y, et al. Akt activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and *c-myc* expression. *J Biol Chem.* 2004; 279: 2737-2746.
69. Choi Y, Zhang J, Murga C, et al. PTEN, but not SHIP and SHIP2, suppresses the PI3K/Akt pathway and induces growth inhibition and apoptosis of myeloma cells. *Oncogene.* 2002; 21: 5289-5300.
70. Thomas GV, Tran C, Mellinghoff IK, et al. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of the mTOR in kidney cancer. *Nat Med.* 2006; 12: 122-127.
71. Kim DK, Cho ES, Yoon J-H, et al. FLIP is constitutively hyperexpressed in Fas-resistant U266 myeloma cells, but is not induced by IL-6 in Fas-sensitive RPMI8226 cells. *Mol Cells.* 2000; 10: 552-556.
72. Zhang XD, Franco A, Myers K, et al. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res.* 1999; 59: 2747-2753.

73. Jin Z, McDonald III R, Dicker DT, et al. Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2004; 279: 35829-35839.
74. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, et al. Activation of the NF- κ B and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene.* 2002; 21: 5673-5683.
75. Gajate C, Mollinedo F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood.* 2007; 109: 711-719.
76. Delmas D, Rébé C, Micheau O, et al. Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene.* 2004; 23: 8979-8986.