

Efeito da Talidomida sobre progenitores de granulócito-macrófagos *in vitro*

Effect of thalidomide on progenitors of granulocyte-macrophages *in vitro*

Lucas L Marostica^I
Marcio Alvarez-Silva^{II}
Cidônia L Vitori^{III}

^I Pós-graduando em Hematologia. UFSC. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas. CEP 88040-970, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil..

^{II} Docente associado. UFSC. Centro de Ciências Biológicas. Departamento Biologia Celular, Embriologia e Genética. CEP 88040-970, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

^{III} Docente associado. UFSC. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas. CEP 88040-970, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

RESUMO - Devido à grande capacidade proliferativa do tecido hematopoiético, as células da medula óssea são alvo de ação tóxica de fármacos. A talidomida é um fármaco com atividade antitumoral, antiangiogênica e imunomoduladora, no entanto, seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. No Brasil, é indicado e permitido seu uso terapêutico no tratamento do eritema nodoso leproso e também no mieloma múltiplo recidivo a quimioterapia. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial mielossupressor da talidomida, verificando se o mesmo pode induzir alterações na produção de células sanguíneas. Realizou-se cultura clonal de progenitores hematopoiéticos, coletados da medula óssea de camundongos e cultivados em meio semi-sólido contendo GM-CSF, em concentrações de 5 a 140 μ M de talidomida. A avaliação da cultura foi realizada por meio de microscopia ótica. Através deste estudo, observamos que a talidomida demonstrou capacidade de inibir a proliferação de precursores de granulócito-macrófagos normais *in vitro*, com uma dose efetiva de 50% (IC50) de 45 μ M, levantando a hipótese de que dificilmente pode induzir mielossupressão quando realizada sua administração terapêutica, já que este valor de IC50 difere bastante em relação à concentração plasmática máxima da droga que pode ser absorvida durante a sua administração.

Palavras-chave: Hematopoiese. Toxicidade. Células sanguíneas.

ABSTRACT - Due to the high proliferative capacity of hematopoietic tissues, bone marrow cells are frequent targets of the toxic action of drugs. Thalidomide is a drug with antitumor, antiangiogenic and immunomodulatory activities; however, its mechanism of action is still not fully understood. In Brazil, it is approved for use in the treatment of erythema nodosum leprosum and relapsing multiple myeloma. The aim of this study was to evaluate the myelosuppressive potential of thalidomide in blood cell stem cells by assessing whether it can induce changes in the production of blood. A clonal culture of hematopoietic progenitors was established using cells collected from the bone marrow of mice; the cells were cultured in semi-solid medium containing GM-CSF and thalidomide at concentrations of 5-140 μ M. The evaluation of the culture was performed by optical microscopy. In this study, we observed that thalidomide could inhibit the proliferation of precursors of normal granulocyte-macrophages *in vitro* with an IC₅₀ of 45 μ M. However, we hypothesize that thalidomide is unlikely to induce myelosuppression when administered therapeutically, since this IC₅₀ value differs significantly from the maximum plasma concentration of drug that can be absorbed during this type of administration.

Keywords: Hematopoiesis. Toxicity. Blood cells.

INTRODUÇÃO

Na medula óssea, as células-tronco hematopoiéticas sofrem divisão para formar dois tipos de células: uma nova célula-tronco e uma célula progenitora comprometida com uma determinada linhagem celular. As últimas células são chamadas de unidades formadoras de colônias (CFU, do inglês *colony-forming units*), porque depois de dividirem-se várias vezes mais, cada qual formará um clone de células diferenciadas (LODISH *et al.*, 2002).

Devido à grande capacidade proliferativa do tecido hematopoiético, as células da medula óssea são alvos freqüentes da ação tóxica de xenobióticos. Desta forma, a avaliação da integridade da hematopoiese é um parâmetro importante para o entendimento dos mecanismos envolvidos na alteração da produção normal de células sanguíneas (VALADARES, 2004). A medula óssea suprimida pelas drogas torna-se incapaz de repor os elementos sanguíneos circulantes. A consequência é a leucopenia, a anemia e/ou trombocitopenia, que podem trazer diferentes complicações para o paciente que utiliza estes fármacos (BONASSA, 2000).

A talidomida é um fármaco de ação antitumoral, antiangiogênico e imunomodulador com grande espectro de atividades, os quais ainda não são claramente compreendidos. Os dados atuais sugerem que a ação da talidomida está relacionada com vários mecanismos, incluindo supressão do fator de necrose tumoral α (TNF α), efeitos sobre fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), interleucinas, interferons e ainda interfere nas moléculas de adesão, tendo possivelmente atuação no estroma da medula óssea (RAJKUMAR *et al.*, 2005). Atualmente a talidomida vem sendo proposta como uma alternativa terapêutica em algumas patologias que provocam alterações na organização do microambiente hematopoiético, tais como o mieloma múltiplo refratário a

quimioterapia (SCHEY *et al.*, 2003), mielofibrose e síndromes mielodisplásicas (RAZA *et al.*, 2001).

Os ensaios clonogênicos simulam a hematopoiese *in vitro*, sendo sistemas de cultura de células progenitoras hematopoiéticas, geralmente em meio semi-sólido (DELDAR, 1993; DELDAR, 1994). *In vitro*, em presença de meio de cultura para tecidos e de uma mistura de citocinas específicas para cada linhagem celular, os progenitores formam colônias distintas fenotipicamente de células diferenciadas. A estas células deu-se o nome de unidades formadoras de colônias ("Colony Forming Unit", CFU) (PARENT-MASSIN, 2001; MALERBA *et al.*, 2004). Utilizando curvas de dose-efeito é possível determinar como referência as concentrações inibitórias para 50% ou 90% de proliferação celular, ou seja, o IC₅₀ ou IC₉₀, respectivamente (PARENT-MASSIN, 2001; PESSINA *et al.*, 2001). A quantificação da mielotoxicidade é feita a partir do número de células progenitoras sobreviventes em função do nível de exposição ao xenobiótico na presença de concentrações máximas do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (GRIBALDO, 2002; PESSINA *et al.*, 2003; DIODOVICH *et al.*, 2004).

A maioria dos estudos relacionados com a Talidomida aborda o seu efeito em células mononucleares, entretanto, os granulócitos constituem a primeira linha de defesa imunológica frente a microorganismos patogênicos (JUFFERMANS *et al.*, 2001). A talidomida foi utilizada primeiramente na Europa a partir de 1950 para o tratamento de enjôo matinal em gestantes e também como sedativo, no entanto, a partir de 1962 foi retirada do mercado após constatação do nascimento de cerca de 12.000 crianças com problemas de má formação fetal devido à administração da talidomida por gestantes na época. No entanto, os estudos com este fármaco continuaram e atualmente pesquisas avaliam a efetividade do mesmo em diferentes neoplasias,

tais como: mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas, mielofibrose, leucemias agudas, câncer de próstata, sarcoma de Kaposi, dentre outros (DIMOPOULOS et al., 2004). As referidas patologias já ocasionam certo dano a hematopoiese normal, portanto, é importante avaliar se este fármaco demonstra efeito inibitório sobre a proliferação de CFU-GM normais *in vitro*.

A mielossupressão induzida pela maioria dos fármacos antineoplásicos inclui: anemia, trombocitopenia e/ou neutropenia (MICELI et al., 2008). Atualmente o que se sabe é que a talidomida pode atenuar a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* (JUFFERMANS et al., 2001) e também ocasionar neutropenia o que pode elevar o risco do paciente que faz administração do fármaco apresentar maior risco de infecções primárias e/ou até mesmo de infecções recorrentes (MARRS, 2006). A mielossupressão é caracterizada pela redução da atividade da medula óssea, resultando na redução da contagem absoluta de eritrócitos, plaquetas e/ou leucócitos (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2007), representando uma importante causa de suspensão do tratamento farmacológico, aumento do período de internação em hospitais e clínicas, aumento dos custos com os pacientes além dos prejuízos para a própria qualidade de vida do paciente que utiliza o fármaco (MICELI et al., 2008). Através deste estudo, temos por objetivo avaliar a atuação da talidomida sobre progenitores hematopoiéticos de granulócitos e macrófagos (colony forming unit – granulocyte macrophage-CFU-GM) normais *in vitro*, visando compreender melhor o efeito deste fármaco sobre a produção de células sanguíneas.

MATERIAL E MÉTODOS

Modelo Experimental

Foram utilizados 40 camundongos Swiss machos com idade entre 45 e 60 dias, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. O projeto para uso destes animais na pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFSC sob o número PP00267, em processo cadastrado sob número 23080.042985/2008-69. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e em seguida foram coletadas as células da medula óssea dos fêmures dos mesmos, conforme descrito anteriormente (VITURI et al., 2008). Os fêmures foram retirados com auxílio de pinças e tesoura, retirando-se o máximo possível de pele e tecidos circundantes dos fêmures, para evitar contaminação da amostra. Esse procedimento foi realizado fora do fluxo laminar. No fluxo laminar, os fêmures foram limpos com gazes e as epífises cortadas. A medula óssea foi coletada com auxílio de uma seringa com agulha contendo meio de cultura específico, sendo que todos os materiais foram previamente autoclavados.

Obtenção e preparo da solução de Talidomida

Os comprimidos de Talidomida foram adquiridos através de uma doação do Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON). Soluções estoque de talidomida foram preparadas numa concentração de 10 mg/mL (10mM) por dissolução do comprimido com dimetilsulfóxido (Sigma) (DMSO)/H₂O (1:1), sendo posteriormente filtradas à vácuo utilizando-se filtro de 0,22 µm, aliqüotados em tubos eppendorf e congeladas. Nos experimentos, foram realizadas as diluições da talidomida com o meio de Iscove's modificado por Dulbecco (Sigma) para obter as diferentes concentrações a serem testadas nas respectivas culturas.

Meio de Cultura

Foi utilizado o meio de Iscove's modificado por Dulbecco (Sigma), contendo L-glutamina tamponado com 25mM de HEPES (Sigma), suplementado com 10% (v/v) de soro de cavalo (Sigma); 5 x 10⁻⁷M de succinato de hidrocortisona (Eurofarma) e antibiótico (Penicilina e Estreptomicina – Invitrogen), diluído em água de Mili-Q estéril.

Ensaio clonogênico CFU-GM

O ensaio clonogênico foi realizado em capela de fluxo laminar, com rigorosa assepsia e esterilidade do material. Foram utilizadas placas de cultura estéreis com 6 poços (well) de 35mm de diâmetro cada. As placas foram preparadas em duas camadas de 1 mL cada, a primeira denominada de camada base (para sustentação) e acima desta a camada de células.

A camada base foi composta de 0,3ml de Meio Iscove's (Sigma) 2x concentrado, 0,3 mL de Soro Bovino Fetal (Invitrogen) e 0,4 mL de Agar semi-sólido 1,25%. A camada de células foi composta por 0,2 mL de Meio Iscove's (Sigma) 2x concentrado adicionado de 1% de albumina bovina (Sigma), 0,3 mL de Soro Bovino Fetal (Invitrogen), 0,3 mL de Agar semi-sólido 1,25%, 0,1 mL de GM-CSF (Sigma) 5ng/mL e 0,1 mL de suspensão de células da medula óssea (1x10⁵ células nucleadas/ml). Na cultura tratada, foram adicionadas na suspensão de células, a partir da solução estoque, as seguintes concentrações de Talidomida: 5 µM; 20 µM; 35 µM; 50 µM; 60 µM; 70 µM; 80 µM; 100 µM; 120 µM e 140 µM. Nestas placas a concentração final de DMSO oscilou entre 0.1% e 0.37%, as quais não são letais para as células (BARTOLOVIC, 2004). No controle, a cultura foi realizada na ausência de talidomida, e, foi adicionado na suspensão de células 0.37% de DMSO, para assegurar as mesmas condições de cultivo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e nas mesmas condições experimentais. Após a preparação das 2 camadas do cultivo celular, as placas foram incubadas por 7 dias em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este período, o número de colônias

formadas foi quantificado por meio de microscopia invertida, considerando-se uma colônia de progenitor quando esta apresentou 50 ou mais células (PARENT-MASSIN, 2001). Paralelamente as culturas foram coradas com corante hematológico MayGrunwald Giemsa e fotografadas. O valor de IC50 (concentração inibitória de 50% da proliferação celular) foi calculado através da equação da reta pelo software Excel 2003.

Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados foi verificada através da análise de variância de one way ANOVA complementada pelo teste t de student. Os resultados foram plotados em gráficos construídos através do programa computacional Prism 5 for Windows v. 5.01 (1992-2007, GraphPad Softwares, Inc., San Diego, Ca, USA), calculando-se a média, erro padrão da média e *p* dos resultados, considerando-se significância estatística quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme demonstrado no gráfico 1, pode-se observar que a partir da concentração de 5 μM a talidomida exerce um efeito inibitório estatisticamente significativo sobre a proliferação de CFU-GM, no entanto, a IC50 obtida neste estudo foi de 45 μM . A IC 50, obtida neste estudo, indica improvável efeito inibitório da talidomida nestas linhagens de

células hematopoiéticas, pois dificilmente o fármaco pode alcançar esta concentração plasmática após ser absorvido. Esses resultados corroboram com estudos anteriores que demonstraram que apenas uma minoria dos pacientes tratados com a talidomida, cerca de 3 a 14%, apresentou mielossupressão (ESCUDIER et al., 2002). No presente estudo, a concentração do fármaco que inibiu totalmente a proliferação celular foi de 140 μM (Figura 1).

Comparando-se a IC50 da talidomida obtida neste estudo com estudos abordando outros fármacos antineoplásicos, pode-se observar que a IC50 e IC90 da talidomida em progenitores CFU-GM normal foi de 45 μM e 140 μM , respectivamente, enquanto que, por exemplo, os valores de IC90 da mecloretamina e melphalan em culturas CFU-GM foram de 45 μM e 12,4 μM , respectivamente (VOLPE; WARREN, 2003). Com estas comparações, observa-se que a toxicidade da talidomida encontrada neste estudo foi menor em comparação com estes fármacos antineoplásicos citados anteriormente. Apesar disso, alguns estudos descrevem os efeitos de neutropenia, um dos efeitos característicos da mielossupressão, em pacientes que fizeram uso da talidomida e isto representaria todos os prejuízos da mielossupressão.

Mesmo com estes dados, ressaltamos que a Talidomida, assim como qualquer outro fármaco utilizado em neoplasias poderá ocasionar efeitos indesejados acumulativos durante o tratamento, sendo importante o acompanhamento e monitoramento médico do paciente que faz o uso deste fármaco, justamente para evitar ou conduzir de forma

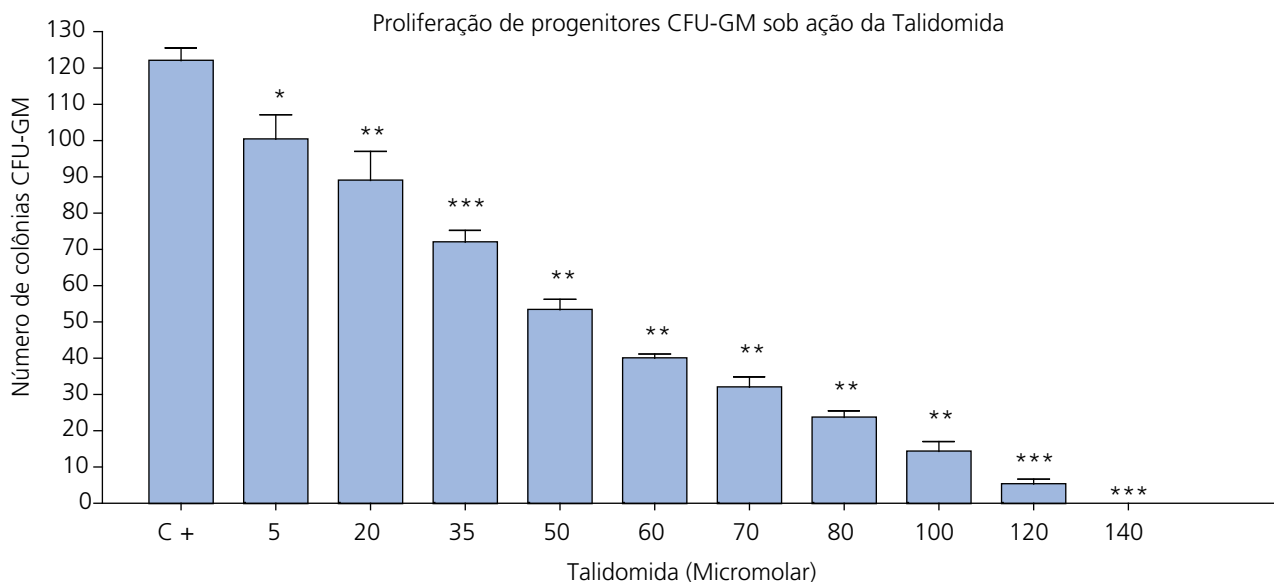


Gráfico 1. Proliferação de progenitores hematopoiéticos de granulócitos e macrófagos *in vitro* expostos ao fármaco Talidomida em diferentes concentrações do mesmo, em três experimentos independentes e nas mesmas condições experimentais. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. Através da análise de variância de oneway ANOVA seguido do teste t pareado de Tukey comparou-se a diferença estatística de cada grupo (concentração do fármaco) em relação ao controle positivo (cultura somente contendo células). * $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$.

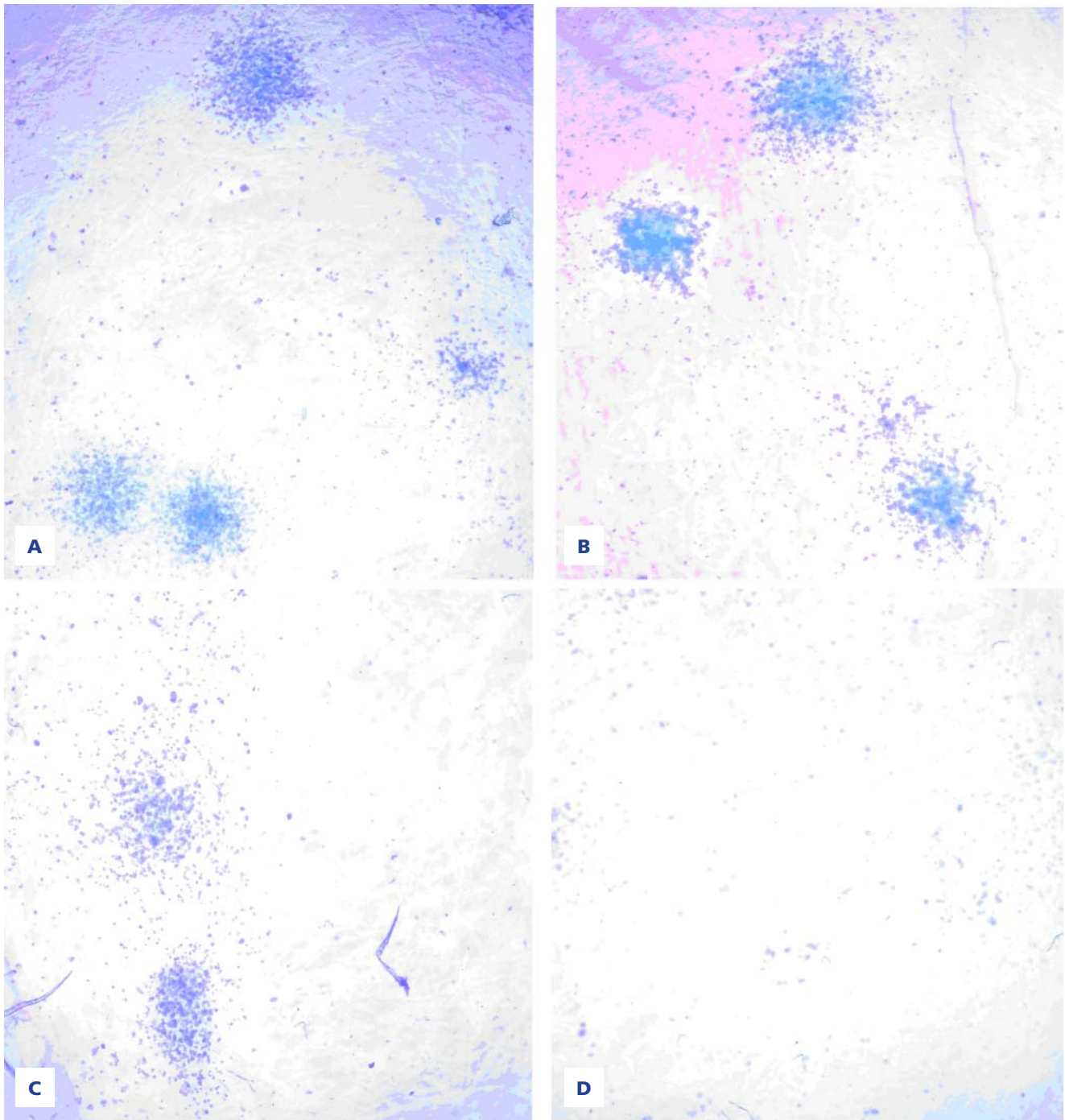


Figura 1. Colônias de progenitores hematopoiéticos CFU-GM expostas a Talidomida e coradas com Maygrunwald Giemsa após 7 dias de crescimento. Cultura controle + (A), cultura com 20 μ M de Talidomida (B), cultura com 60 μ M de Talidomida (C) e cultura com 140 μ M de Talidomida (D).

adequada a mielossupressão que podem surgir durante a terapêutica com o mesmo. Geralmente, o paciente em tratamento com a talidomida inicia com dosagens que variam entre 100 a 200 mg/dia, porém de acordo com necessidades clínicas do paciente esta dosagem pode aumentar de forma progressiva até atingir doses entre 400 a 800 mg/dia (Dimopoulos *et al.*, 2004). Isto pode representar também um aumento de possibilidade de toxicidade do fármaco para

com estes pacientes, possibilitando talvez o aparecimento de uma mielossupressão ou até mesmo o agravamento de uma supressão já existente. É neste quesito que se torna de extrema importância a necessidade da profilaxia e detecção dos efeitos adversos do medicamento, que podem ser através de: ajuste de dose, procurar evitar administração de outros fármacos que potencializem os efeitos da talidomida, interrupções temporárias no uso da talidomida, administração

simultânea de fármacos que atenuem os possíveis efeitos indesejados (anemia, neutropenia, trombocitopenias, dentre outros), e também o monitoramento clínico e laboratorial tanto para detecção quanto para a prevenção da toxicidade.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados do presente estudo, verifica-se que a Talidomida exerce um efeito dose-dependente significativo na inibição da proliferação de progenitores de granulócitos e macrófagos *in vitro* a partir de 5 µM alcançando a IC50 45 µM e a IC90 em 140 µM. Desta forma indica a possibilidade da mesma causar supressão da produção destas células

sanguíneas, o que poderia implicar em algum comprometimento na defesa imunológica exercida por estas células, durante a terapêutica com altas doses deste fármaco, principalmente se houver administração simultânea de outros medicamentos. No entanto, novos estudos sobre o tema são necessários, principalmente para elucidar a ocorrência destes efeitos de inibição em outros progenitores hematopoiéticos, tal como os progenitores da série eritrocítica e plaquetária.

SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi apoiado financeiramente pela FAPESC contrato nº. 122.56/2007-4.

REFERÊNCIAS

- BARTOLOVIC K; BALABANOV S & HARTMANN U. Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells in vitro. *Blood*, 103: 523-529, 2004.
- BONASSA, E.M.A. Toxicidade Hematológica. In: Enfermagem em Quimioterapia. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 75-83.
- DELDAR, A. & STEVENS, C. E. Development and application of in vitro models of hematopoiesis to drug development. *Toxicol. Pathol.* 21: 231-240, 1993.
- DELDAR, A. Drug-induced blood disorders: Review of pathogenetic mechanisms and utilization of bone marrow cell culture technology as an investigative approach. *Curr. Topics Vet. Res.* 1: 83-101, 1994.
- DIMOPOULOS, A.M. & PAPAIAKOVOU, V.E. Adverse effects of Thalidomide administration in patients with neoplastic diseases. *Am. J. Med.* 117: 508-515, 2004.
- DIODOVICH, C.; BIANCHI, M. G.; BOWE, G. *et al.* Response of human cord blood cells to styrene exposure: evaluation of its effects on apoptosis and gene expression by genomic technology. *Toxicology.* 200: 45-57, 2004.
- ESCUDIER, B.; LASSAU, N.; COUANET, D. *et al.* Phase III trial of thalidomide in renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.* 13(7): 1029-1035, 2002.
- GRIBALDO, L. Haematotoxicology: scientific basis and regulatory aspects. *Altern. Lab. Anim.* 30(2): 111-113, 2002.
- JUFFERMANS, N.P.; VERBON, A.; SCHULTZ, M.J. *et al.* Thalidomide inhibits granulocyte response in healthy humans after ex vivo stimulation with bacterial antigens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1547-1549, 2001.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L. MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. *Biologia Celular e Molecular.* 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 1054 p.
- MALERBA, I.; CASATI, S.; DIODOVICH, C. *et al.* Inhibition of CFU-E/BFU-E and CFU-GM colony growth by cyclophosphamide, 5-fluorouracil and taxol: development of a high-throughput in vitro method. *Toxicol In Vitro.* 18: 293-300, 2004.
- MARRS, J.A. Care of patients with neutropenia. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 10(2): 164-166, 2006.
- MICELI, T.; COLSON, K.; GAVINO, M. *et al.* Myelosuppression associated with novel therapies in patients with multiple myeloma: Consensus statement of the IMF nurse leadership board. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 12: 13-20, 2008.
- PARENT-MASSIN, D. Relevance of clonogenic assays in hematotoxicology. *Cell Biol. Toxicol.* 17(2): 87-94, 2001.

- PESSINA, A.; ALBELLA, B.; BAYO, M. et al. Application of the CFU-GM assay to predict acute drug-induced neutropenia: an international blind trial to validate a prediction model for the maximum tolerated dose (MTD) of myelosuppressive xenobiotics. *Toxicol Sci.* 75: 355-367, 2003.
- PESSINA, A.; ALBELLA, B.; BUEREN, J. et al. Prevalidation of a model for predicting acute neutropenia by colony forming unit granulocyte/macrophage (CFU-GM) assay. *Toxicol In Vitro.* 15(6): 729-40, 2001.
- RAJKUMAR, S. V. Thalidomide Therapy and Deep Venous Thrombosis in Multiple Myeloma. *Mayo Clin. Proc.* 80(12): 1549-1551, 2005.
- RAZA, A; MEYER, P; DUTT, D. et al. Thalidomide produces transfusion independence in long-standing refractory anemia of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood.* 98(4): 958-965, 2001.
- SCHEY, S.A; CAVENAGH, J; JOHNSON, R. et al. An UK myeloma forum phase III study of thalidomide: long-term follow-up and recommendations for treatment. *Leuk. Res.* 27: 909-914, 2003.
- SIEGEL, D. & CROWLEY, J. Anti-tumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 341: 1565-1571, 1999.
- VALADARES, M. O uso de cultura clonal de precursores hematopoiéticos na investigação do potencial mielossupressivo de novas substâncias. *Rev. Eletr. Farm.* 1: 44-51, 2004.
- VITURI, C.L; ALVAREZ-SILVA, M; TRENTIN, A.G. et al. Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mielóides in vitro no modelo de desnutrição protéica em camundongos. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 44(3): 494-501, 2008.
- VOLPE, D.A. & WARREN, M.K. Myeloid clonogenic assays for comparison of the in vitro toxicity of alkylating agents. *Toxicol In Vitro.* 17: 271-277, 2003.

Recebido em 13/04/2010
Revisado em 22/06/2010, 22/07/2010 e 24/08/2010
Aceito em 24/08/2010

Correspondência:

Cidônia L. Vituri
C. L. Vituri. Universidade Federal de Santa Catarina.
Departamento de Análises Clínicas.
Centro de Ciências da Saúde (CCS).
88040-970
Florianópolis - Santa Catarina, Brasil
cids@ccs.ufsc.br