



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ingrid Estevam Pereira

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE
NOVOS ANÁLOGOS DA TALIDOMIDA CONTENDO UMA
ESTRUTURA FTALIMIDA ABERTA**

Dissertação

2017

INGRID ESTEVAM PEREIRA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE
NOVOS ANÁLOGOS DA TALIDOMIDA CONTENDO UMA
ESTRUTURA FTALIMIDA ABERTA**

Dissertação do Curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Área: Imunologia
e Doenças Infecto-Parasitárias, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas: Área: Imunologia e Doenças
Infecto-Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

Juiz de Fora
2017

DEDICATÓRIAS

*Aos meus pais, Rosa e Gilberto,
pelo amor incondicional, por me ensinarem o
valor do trabalho, da honestidade e a
importância da perseverança...*

*Aos amigos e familiares, pela
presença constante em minha vida.... pela
compreensão e carinho*

A Deus

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que foram os sólidos alicerces para esta conquista.

A minha irmã, Erika, e minha sobrinha, Laura, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

A minha avó, Oneida, e minha tia, Cidinha, por estarem sempre tão próximas, mesmo com toda a distância.

Especial agradecimento aos amigos Kátia e Edney pelo esforço, ética, profissionalismo e, sobretudo, pelas pessoas formidáveis, o que os tornam exemplos a serem seguidos.

Ao meu orientador prof. Dr. Henrique Couto Teixeira pela contribuição de forma intensa, na minha formação e de outros tantos colegas.

A prof^a. Dr^a. Eliana Faquim, do Departamento de Imunopatologia do Instituto Butantan, pela disponibilidade e atenção, essenciais para a conclusão deste trabalho.

A Dr^a. Caroline de Souza Almeida, por seus ensinamentos, pelo seu apoio, paciência e auxílio em diversos experimentos.

A aluna de iniciação científica, Laura Menegati, pela prontidão em ajudar, sempre, pelas horas de dedicação e empenho.

Ao prof. Giovanni Amarante pela concessão do objeto de estudo deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunologia da UFJF, aos professores do departamento e a CAPES pela concessão da ajuda financeira.

EPÍGRAFE

*“A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por
nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode
poupar ou fazer por nós”*

(Marcel Proust)

RESUMO

A talidomida é uma potente droga anti-inflamatória empregada no tratamento de diversas patologias, incluindo Eritema Nodoso Leproso (ENL), câncer, doença de Crohn e outras desordens inflamatórias e vasculares. Entretanto, seus efeitos tóxicos e teratogênicos tornam sua utilização limitada e motivam pesquisas para a síntese de análogos que apresentem eficácia semelhante na imunomodulação, sem efeitos tóxicos. Diversos análogos da talidomida vêm sendo desenvolvidos no laboratório de química da UFJF. Em estudos anteriores, mostramos que a introdução de dois anidridos ftálicos na composição aumenta significativamente a atividade biológica e solubilidade em água do composto, sem aumento da toxicidade em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. O presente trabalho visa a síntese de dois novos compostos análogos da talidomida, CAT-15 e CAT-16, formados por apenas um derivado anidrido ftálico aberto, mantendo um grupo amino livre, e a avaliação da sua atividade anti-inflamatória utilizando linhagem de célula HT-29 e células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) estimuladas com LPS. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada pelo ensaio do MTT, com tratamento por 18 horas para células HT-29 e por 24 e 48 horas para PBMC, usando concentrações crescentes de talidomida, CAT-15, CAT-16. A dexametasona foi utilizada como controle positivo. A produção de TNF- α , CXCL-10, IL-6, IL-8 e IL-10 foi avaliada pelo método de ELISA. Os novos compostos não foram tóxicos para as células HT-29 e PBMC em nenhuma das concentrações testadas, com exceção de CAT-16 a 1600 μ M. Células HT-29 produziram grande quantidade de CXCL-10 em resposta ao LPS e os resultados deste trabalho mostram que a talidomida e os análogos CAT-16 e CAT-15 apresentam atividade inibitória sobre a produção desta quimiocina. O composto CAT-16 modulou a produção de CXCL-10 em concentrações menores que a talidomida em ambos os modelos de tratamento (simultâneo e pré-tratamento). Em contrapartida, a modulação por CAT-15 foi observada apenas no modelo de pré-tratamento. Com relação a IL-8, a talidomida e o CAT-16 inibiram a produção desta citocina por células HT-29 apenas na concentração de 100 μ M. Ao contrário das células HT-29, o PBMC produziu TNF- α em resposta ao LPS, tendo a talidomida e o análogo CAT-16 apresentado capacidade de inibição da produção do TNF- α em ambos os tempos de tratamento. O análogo CAT-15 não influenciou a produção de TNF- α por PBMC em nenhuma das concentrações e tempos de tratamento. Este estudo também mostra a atividade da talidomida e dos análogos sobre a produção de IL-6 e IL-10 por PBMC, havendo significativa inibição da produção de IL-6 por todos os compostos e tempos de tratamento e sobre IL-10 pelo composto CAT-15 após 48 horas de incubação. Nossos resultados sugerem a aplicabilidade dos novos compostos, CAT-15 e CAT-16, no controle de respostas inflamatórias uma vez que inibiram a produção de moléculas chave como TNF- α , IL-6, IL-10, IL-8 e CXCL-10. Ainda, esses compostos possuem estruturas simplificadas, têm baixo custo de produção, são hidrossolúveis e não possuem centro quiral. Esses resultados podem contribuir no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para certas condições inflamatórias.

Palavras-chave: Talidomida. Análogos. Anidrido ftálico. Citocinas. TNF- α . HT-29.

ABSTRACT

Thalidomide is a potent anti-inflammatory drug used in the treatment of various pathologies including Erythema Nodosum Leprosum (ENL), cancer, Crohn's disease and other inflammatory and vascular disorders. However, its toxic and teratogenic effects make its use limited and motivate research groups to synthesize analogues presenting similar immunomodulation efficacy, without toxic effects. Several analogs of thalidomide have been developed in the laboratory of chemistry of the UFJF. Previously, we have shown that introduction of two phthalic anhydrides into the composition significantly enhances biological activity and water solubility, without enhanced toxicity. The present work aims at the synthesis of two new analogues of thalidomide, CAT-15 and CAT-16, formed by only one open phthalic anhydride derivative, maintaining a free amino group, and the evaluation of its anti-inflammatory activity using HT-29 and human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated with LPS. The cytotoxicity of the compounds was evaluated by the MTT assay, with 18 hours treatment for HT-29 cells and for 24 and 48 hours for PBMC, using increasing concentrations of thalidomide, CAT-15, CAT-16. Dexamethasone was used as a positive control. Production of TNF- α , CXCL-10, IL-6, IL-8 and IL-10 was evaluated by the ELISA method. The novel compounds were not toxic to HT-29 and PBMC cells at any of the concentrations tested, with the exception of CAT-16 at 1600 μ M. HT-29 cells produced large amounts of CXCL-10 in response to LPS and the results of this work show that thalidomide and the CAT-15 and CAT-16 analogs exhibit inhibitory activity on the production of this chemokine. CAT-16 compound modulated the production of CXCL-10 at lower concentrations than thalidomide in both treatment models (simultaneous and pretreatment). In contrast, CAT-15 modulation was observed only in the pre-treatment model. Regarding IL-8, thalidomide and CAT-16 inhibited their production by HT-29 cells only at the concentration of 100 μ M. Unlike HT-29 cells, PBMC produced TNF- α in response to LPS, with thalidomide and CAT-16 analog being able to inhibit TNF- production at both treatment times. The CAT-15 analogue did not influence the production of TNF- α by PBMC at any of the concentrations and treatment times. This study also shows the activity of thalidomide and the analogs on IL-6 and IL-10 production by PBMC, with significant inhibition of IL-6 production by all compounds and treatment times and on IL-10 by compound CAT-15 after 48 hours of incubation. Our results suggest the applicability of the new compounds, CAT-15 and CAT-16, in the control of inflammatory responses since they inhibited the production of key molecules such as TNF- α , IL-6, IL-10, IL-8 and CXCL-10. Furthermore, these compounds have simplified structures, and low cost of production, are water soluble and have no chiral center. These results may contribute to the development of novel treatment strategies for certain inflammatory conditions.

Keywords: Thalidomide. Phthalic anhydrides. Citokines. TNF- α . HT-29.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação estrutural da molécula de talidomida.....	16
Figura 2	Representação estrutural da talidomida e seus enantiômeros.....	17
Figura 3	Mecanismos de ação da talidomida	24
Figura 4	Estrutura e peso molecular dos compostos originais, GI-16 e SC-15 e dos novos compostos CAT-15 e CAT-16	29
Figura 5	Fotomicrografia das células da linhagem HT-29.....	30
Figura 6	Organograma de planejamento e elaboração dos ensaios propostos no projeto	34
Figura 7	RMN de ¹ H (500 MHz, D ₂ O) do composto CAT-15.....	35
Figura 8	RMN de ¹ H (500 MHz, D ₂ O) do composto CAT-16.....	36
Figura 9	Efeito do tratamento com DMSO nas concentrações 0,01%, 0,1% e 0,2% na viabilidade de células HT-29 pelo ensaio de MTT.....	42
Figura 10	Efeito do tratamento com talidomida, CAT-16 e CAT-15 e dexametasona na viabilidade de células HT-29 pelo ensaio de MTT.....	43
Figura 11	Efeito do tratamento com DMSO na concentração 0,1% na viabilidade de PBMC pelo ensaio de MTT.	44
Figura 12	Efeito do tratamento com talidomida, CAT-16 e CAT-15 na viabilidade do PBMC humano pelo ensaio do MTT.....	45
Figura 13	Efeito do tratamento com dexametasona na viabilidade de PBMC pelo ensaio de MTT.....	46
Figura 14	Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de TNF- α pelo PBMC estimulado por LPS por 24 horas.....	48
Figura 15	Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de TNF- α pelo PBMC estimulado por LPS por 48 horas.....	50
Figura 16	Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de IL-6 pelo PBMC estimulado por LPS por 24 horas.	52
Figura 17	Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de IL-6 pelo PBMC estimulado por LPS por 48 horas.	54
Figura 18	Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de IL-10 pelo PBMC estimulado por LPS por 24 horas.	56

Figura 19	Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de IL-10 pelo PBMC estimulado por LPS por 48 horas.	57
Figura 20	Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de CXCL-10 pelas células HT-29 estimuladas por LPS por 18 horas.	59
Figura 21	Efeito do pré-tratamento com talidomida e análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de CXCL-10 pelas células HT-29 estimuladas por LPS.	61
Figura 22	Efeito do pré-tratamento com talidomida e análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de IL-8 pelas células HT-29 estimuladas por LPS por 18 horas.	64
Figura 23	Microscopia óptica da cultura de células de adenocarcinoma colorretal humano, HT-29 cultivadas por 7 dias	84
Figura 24	Produção de CXCL-10 por células HT-29 18 horas após estímulo com concentrações crescentes de LPS, IFN- γ e combinações variadas de LPS + IFN- γ	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Pesquisa e desenvolvimento de análogos da talidomida ao longo dos anos.	27
Tabela 2 Produção de CXCL-10 frente ao tratamento simultâneo e pré-tratamento de células HT-19 com talidomida, CAT-16 e CAT-15	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	“Acquired immunodeficiency syndrome” - Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	“Antigen presenting cell” - Célula apresentadora de antígeno
ANOVA	Análise de variância
ABPST	Associação Brasileira de Portadores da Síndrome da Talidomida
CD80	“Cluster of differentiation 80” - Grupo de diferenciação 80
CO ₂	Dióxido de carbono
DAMP	“Damage-associated molecular pattern” - Padrões moleculares associados a danos
DII	Doença inflamatória intestinal
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium” - Meio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimethyl sulfoxide - Dimetil-sulfóxido
DNA	“Desoxiribonucleic acid” - Ácido desoxirribonucleico
EDTA	“Ethylenediaminetetraacetic acid” - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” - Ensaio imunoenzimático
ENL	Eritema nodoso leproso
FDA	“Food and Drug Administration” - Administração de alimentos e drogas
FGF β	“Basic fibroblast growth factor” - Fator de crescimento de fibroblastos
FGF8	“Fibroblast growth factor 8” - Fator de crescimento de fibroblasto 8
FGF10	“Fibroblast growth factor 10” - Fator de crescimento de fibroblasto 10
GR	“Glicocorticoid receptor” - Receptor de glicocorticoide
ICAM	“Intercellular adhesion molecule” – Molécula de adesão intercelular
IFN	Interferon
IL	Interleucina
I κ B α	“Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha” - Inibidor κ B
LPS	Lipopolissacarídeo

MD2	“Myeloid differentiation protein 2” - Proteína de diferenciação mielóide
MTT	Brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazolil-2,5 difeniltetrazólio
MyD88	“Myeloid differentiaton primary - Response protein 88”
NO ₂	Nítrico oxide - Óxido nítrico
NF-κB	“Nuclear factor kappa B” - Fator nuclear kappa B
NK	“Natural Killer cells” - Células assassinas naturais
PBMC	“Peripheral blood mononuclear cells” - Células mononucleares de sangue periférico
PAMP	“Pathogen-associated molecular pattern” - Padrões moleculares associados a patógenos
PI3K	“Phosphoinositide 3-kinase” - Fosfoinositol 3 cinase
PBS	“Phosphatebufferedsaline” - Solução salina tamponada
RPMI	meio de cultura de células RPMI
RNA	“Ribonucleic acid” - Ácido ribonucleico
T _H 2	Linfócitos T auxiliares tipo 2
T _H 1	Linfócitos T auxiliares tipo 1
T _H 17	Linfócitos T auxiliares tipo 17
Treg	Linfócito T regulador
SOCS	“Suppressors of cytokine signalling” – Supressores da sinalização de citocina
STAT	“Signal transducer and activator of transcription” - Transdutor de sinal e ativador de sinalização
TIR	“Domain-containing adapter - Inducing interferon-β”
TLR	“Toll-like receptor 4” - Receptor do tipo-Toll
TNF	“Tumor necrosis factor” - Fator de necrose tumoral
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
VCAM	“Vascular cell adhesion molecule” - Molécula de adesão de células vasculares
VEGF	“Vascular endothelial growth factor” - Fator de crescimento endc vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Talidomida	15
1.2	Propriedades químicas e farmacológicas da talidomida	17
1.3	Talidomida e a inflamação: sua influência sobre citocinas e quimiocinas	18
1.4	Toxicidade e teratogenicidade da talidomida	24
1.5	Talidomida no Brasil	25
1.6	Compostos análogos da talidomida	26
1.7	Modelos de inflamação <i>in vitro</i>	29
1.7.1	Características das células HT-29 e sua importância na pesquisa sobre fármacos	29
1.7.2	Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC humano)	31
1.7.3	LPS e sua atividade pró-inflamatória.....	32
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	MATERIAL e MÉTODOS	34
3.1	Delineamento experimental	34
3.2	Síntese dos análogos CAT-15 e CAT-16.....	35
3.2.1	Síntese do análogo CAT-15	35
3.2.2	Síntese do análogo CAT-16	36
3.3	Cultura de células HT-29	37
3.4	Obtenção do PBMC	37
3.5	Avaliação da viabilidade celular pela técnica de MTT para as células HT-29.....	38
3.6	Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT para o PBMC	39
3.7	Determinação da produção de TNF- α , IL-6, IL-10, CXCL-10, IL-8 pelas células HT-29 estimuladas por LPS e tratadas com talidomida, e seus análogos CAT-16 e CAT-15, e dexametasona.....	39
3.8	Determinação da produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e CXCL-10 pelo PBMC estimulado por LPS e tratados com talidomida, e seus análogos CAT-16 E CAT-15 e dexametasona	40
3.9	Análise estatística	40

4	RESULTADOS.....	41
4.1	Viabilidade das células HT-29 frente a concentrações crescentes de talidomida, CAT-16 e CAT-15 e a Dexametasona.....	41
4.2	Viabilidade do PBMC humano frente a concentrações crescentes de talidomida, CAT-15, CAT-16 e dexametasona	44
4.3	Efeito do pré-tratamento com talidomida e análogos CAT-15 e CAT-16 na produção de TNF- α por PBMC e por células HT-29 estimuladas com LPS	46
4.4	Efeito do pré-tratamento com talidomida e análogos CAT-15 e CAT-16 na produção de IL-6 por PBMC e células HT-29	51
4.5	Efeito do pré-tratamento com talidomida e análogos CAT-15 e CAT-16 na produção de IL-10 por PBMC e células HT-29	55
4.6	Efeito do tratamento com talidomida e análogos CAT-15 e CAT-16 na produção de CXCL-10 por células HT-29 e PBMC.....	58
4.7	Efeito do pré-tratamento com talidomida e análogos CAT-15 e CAT-16 na produção de IL-8 pelas células HT-29	63
5	DISCUSSÃO.....	65
6	CONCLUSÃO	72
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
	APÊNDICE A - Determinação da densidade de inoculação e tempo de cultivo para subconfluência das células T-29	83
	APÊNDICE B - Padronização de estímulos pró-inflamatórios às células HT-29, utilizando LPS e IFN- γ	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Talidomida

A talidomida ou N-alfa-ftalimido-glutarimida (Figura 1) foi sintetizada em 1953 por Wilhelm Kunz, nos laboratórios Chemie Grünenthal, Alemanha. Experimentos feitos em ratos, cobaias e coelhos não mostraram efeitos tóxicos fazendo com que a droga ganhasse o mercado alemão em 1957. Utilizado como sedativo-hipnótico não tóxico, a talidomida se mostrou como uma boa alternativa aos barbitúricos e no tratamento de ansiedade, insônia, enjôos e indisposições matinais, principalmente em mulheres grávidas (OLIVEIRA *et al*, 1999).

A droga ganhou o mercado mundial na década de 60 sendo comercializada em, aproximadamente, 50 países. Paralelamente a sua expansão mundial, ainda em 1959, surgiram os primeiros relatos de efeitos adversos ao uso da talidomida incluindo constipação intestinal, tonturas, perda de memória e polineurite além de casos, em diversas partes do mundo, de malformações congênitas raras relacionadas à exposição à talidomida durante a gestação (OLIVEIRA *et al*, 1999; KESLEY, 1988; YANG *et al*, 2015).

Sua retirada do mercado alemão ocorreu em 1961, pelo próprio laboratório Grünenthal, depois que o obstetra australiano McBride e o pediatra Lenz anunciaram seus estudos em uma série de recém-nascidos de mães tratadas com talidomida durante a gestação, que apresentavam quadros de dismelia variando de focomelia (encurtamento de ossos longos) a amelia (ausência de todo o membro), o que resultou na sua retirada do mercado mundial (PAPASEIT *et al*, 2013).

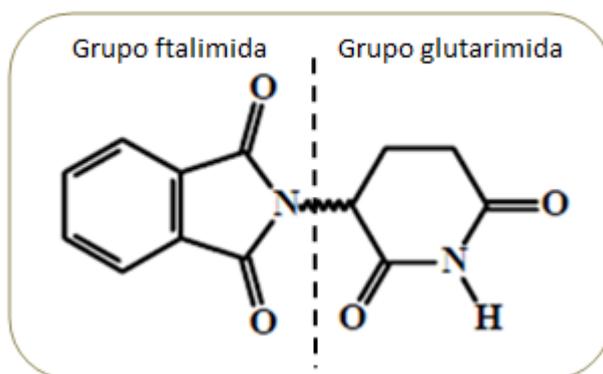


Figura 1 Representação estrutural da molécula de talidomida. A molécula é constituída por um anel ftalimida e um anel glutarimida, sendo as propriedades farmacofóricas atribuídas ao anel ftalimida

Em 1965, quatro anos após a sua retirada do mercado mundial, a talidomida foi utilizada pelo dermatologista israelita, Jacob Sheskin como sedativo para um paciente apresentando lesões dolorosas do eritema nodoso leproso, observando não só a redução da dor, mas também do processo inflamatório. Anos mais tarde, estudos feitos pela Dra. Gilla Kapla e colaboradores (citado por LIMA *et al*, 2001) demonstraram níveis elevados de TNF- α no sangue de pacientes leproso e a participação da talidomida na inibição seletiva dessa citocina, evidenciando, pioneiramente, sua atividade anti-TNF- α . Essa descoberta, propiciou a volta da talidomida ao mercado como agente terapêutico para hanseníase e estimulou novas pesquisas sobre seus efeitos em outras enfermidades relacionadas a processos inflamatórios crônicos e que cursam com elevados níveis séricos de TNF- α (MARRIOTT *et al.*, 1998; LIMA *et al*, 2001).

Atualmente, a talidomida é um importante fármaco com ampla aplicabilidade, tendo sido aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) como opção terapêutica de diversas desordens imunológicas, incluindo ENL, artrite reumatoide, Doença de Chron, além de enfermidades relacionadas a síndrome da imunodeficiência adquirida e neoplasias dependentes de angiogênese como Mieloma Múltiplo (ITO *et al*, 2010; BEEDIE *et al*, 2012). No Brasil o uso da talidomida é rigorosamente controlado e fiscalizado pelo Ministério da Saúde (LIMA *et al*, 2001).

1.2 Propriedades químicas e farmacológicas da talidomida

A talidomida é um derivado sintético da condensação do ácido glutâmico com anidrido ftálico e posterior condensação do intermediário ftalimídico com amônia, apresentando, desta forma, um grupo glutarimida com centro quiral único na posição 3 e um grupamento ftalimida (Figura 2a). Possui duas formas opticamente ativas *R* (+) e *S* (-) e sua forma comercial consiste em uma mistura racêmica desses dois enantiômeros (Figura 2b). Seus efeitos adversos e teratogenicidade são atribuídos ao enantiômero *S* (-) enquanto o efeito sedativo, ao enantiômero *R*(+) (LIMA *et al*, 2001). Porém, a administração de um enantiômero puro não apresenta sucesso pela sua rápida interconversão, sendo que em poucas horas após a absorção, uma nova mistura racêmica se forma (BORGES e FRÖEHLICH, 2003).

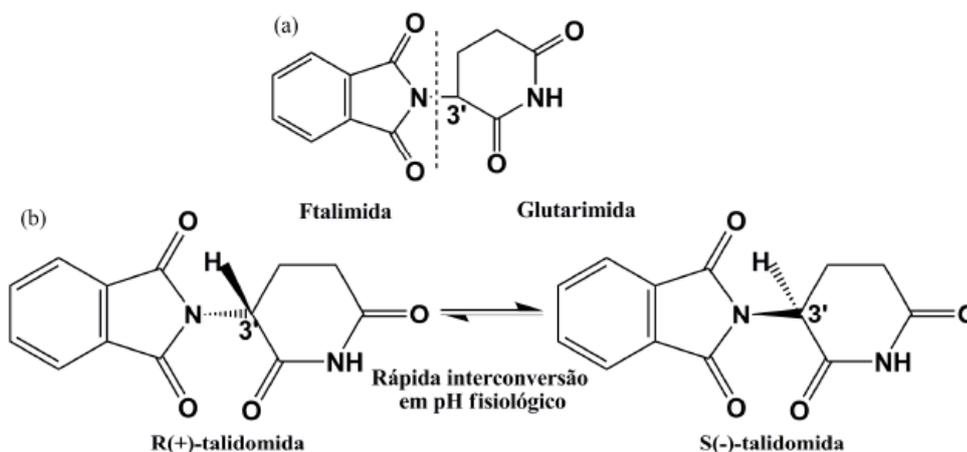


Figura 2 Representação estrutural da talidomida (a) e seus enantiômeros (b). Adaptado de Franks, Macpherson e Figg (2004).

Por ter baixa solubilidade em água, a taxa de eliminação da talidomida é maior que a de absorção, resultando em um pico de concentração plasmática detectável entre 3 e 6 horas, dependendo da dose. Além disso, seu metabolismo é feito majoritariamente pelos rins (SAMPAIO *et al*, 2006).

Ao ser ingerida, a talidomida sofre hidrólise não-enzimática dando origem a mais de 12 a 20 metabólitos (SCHUMACHER *et al*, 1965). Em estudo realizado por Lima *et al* (2001), foi identificada a sua instabilidade em solução aquosa, onde em pH ácido (6,0) a talidomida sofre hidrólise espontânea do anel glutarimídico. Em pH

fisiológico (7,4) sofre hidrólise de ambos, anel glutarimídico e anel ftalimídico. Finalmente, em pH 8,0, sua taxa de metabolização é aumentada, evidenciando que o metabolismo da talidomida é estritamente relacionado ao pH do sistema. Ainda, existe o consenso de que o grupo ftalimida seja farmacofórico, conferindo as propriedades terapêuticas enquanto o grupo glutarimida representa o grupo toxicofórico (ITO *et al*, 2011).

1.3 Talidomida e a inflamação: sua influência sobre citocinas e quimiocinas

A inflamação constitui o principal mecanismo efetor do sistema imune inato e seus propósitos fisiológicos consistem em defender o hospedeiro contra infecções, reparar tecidos, adaptação ao estresse e retorno ao estado de homeostase (MEDZHITOV, 2008). A cascata inflamatória é induzida pelo reconhecimento de sinais que indicam perturbação tecidual (ASHLEY *et al*, 2012). Esses sinais podem ser padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), bem como produtos de lesão tecidual (padrões moleculares associados a dano - DAMPs) (TOSI, 2005).

O reconhecimento de PAMPs e DAMPs é feito por grupos de receptores da imunidade inata, chamados de receptores de reconhecimento de padrões (pattern recognition receptors – PRRs), expressos na superfície celular ou no citoplasma dentre os quais podemos citar: receptores do tipo toll (TLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs) (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000).

A partir desse reconhecimento, os TLRs, que podem estar dispostos na membrana citoplasmática ou em endossomos, iniciam a cascata de sinalização que culmina com a fosforilação da proteína inibidora I κ B, e liberação do fator de transcrição NF- κ B, que transloca ao núcleo e regula a transcrição de diversos genes. A sinalização por NLRs (citoplasmáticos) leva a formação de inflamassomos e ativação de caspase-1, onde ocorre a conversão de IL-1 β e IL-18 em citocinas ativas, as quais induzem inflamação após deixarem a célula (TOSI, 2005; ASHLEY *et al*, 2012).

Diversos mediadores inflamatórios são produzidos e liberados para promover a inflamação dentre eles, citocinas como IL (interleucina) -1, IL-16, IL-10, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e quimiocinas que promovem atração de neutrófilos e macrófagos. A migração destes para o sítio alvo é facilitada pela presença de aminas vasoativas (histamina) e eicosanoides (leucotrienos e prostaglandinas), produzidos por mastócitos e macrófagos residentes, bem como pelo aumento da expressão de E-selectina, molécula de adesão intercelular (ICAM) e molécula de adesão de células vasculares (VCAM) nas células endoteliais. Neutrófilos que migram para o sítio alvo, produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, potencializando a inflamação (MEDZHITOV, 2008; ASHLEY *et al*, 2012).

O sucesso da inflamação aguda consiste na eliminação dos agentes infecciosos seguido de uma fase de resolução, a qual é caracterizada pela mudança dos mediadores lipídicos em lipoxinas, que são anti-inflamatórias e inibem o recrutamento de neutrófilos ao mesmo tempo que promovem o recrutamento de monócitos que removem células mortas e iniciam o remodelamento tecidual (MEDZHITOV, 2008).

A inflamação também permite uma interação entre a imunidade inata e adaptativa, uma vez que as células apresentadoras de antígenos (APCs – neutrófilos e macrófagos), presentes no sítio de inflamação, fagocitam os antígenos e migram em direção ao tecido linfóide, onde promovem a polarização de linfócitos T naíve (T_H0) em linfócitos efetores (T_H1 , T_H2 , Treg e T_H17) (ASHLEY *et al*, 2012). Se a resolução não ocorre na inflamação aguda, tem lugar a inflamação crônica, caracterizada pelo infiltrado de macrófagos e linfócitos T, além da possibilidade de formação de granulomas (MEDZHITOV, 2008; ASHLEY *et al*, 2012).

A ampla gama de atividades biológicas da talidomida se deve a sua habilidade em modular o sistema imune, e a inibição da síntese de TNF- α foi o seu primeiro mecanismo anti-inflamatório descrito (SAMPAIO *et al*, 2006). Essa citocina foi primeiramente descrita como uma substância sérica que provoca necrose de certos tumores (SOUBA, 1994). Sua principal fonte são macrófagos ativado pelo reconhecimento de PAMPs e/ou DAMPs pelos seus receptores de reconhecimento padrão, induzindo inflamação (ROGLER e ANDUS, 1998).

Dentre as ações homeostáticas do TNF- α podemos citar atividade pirogênica, ação no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, estimulando a liberação do

hormônio adrenocorticotrófico e atividade angiogênica por induzir fatores de crescimento endotelial (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Em contrapartida, a produção descontrolada de TNF- α tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, psoríase e esclerose múltipla (KALLIOLIAS e IVASHKIV, 2015), bem como a ações que causam injúrias ao organismo, como produção de proteínas de fase aguda, taquicardia, hipotensão, caquexia, falência de órgãos e morte (SOUBA, 1994).

Borges e Fröhlich (2003) em sua revisão, relatam que o uso da talidomida no tratamento de Hanseníase, causa melhora dos sinais clínicos, acompanhado de redução da produção de TNF- α pelos monócitos. Ainda, neste estudo, é relatado que a redução dos níveis de TNF- α provocado pela talidomida em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, é acompanhado de menor replicação viral. Diversos estudos sobre o uso da talidomida no tratamento de doenças inflamatórias intestinais vêm sendo divulgados e relatam redução dos níveis de TNF- α , com melhora dos sintomas clínicos (SAMPAIO *et al*, 2006; DIAMANTI *et al*, 2015). Sastry (1999) relata, em seu estudo, que o uso da talidomida em cultura de células microgliais fetais humanas estimuladas por LPS (modelo *in vitro* de esclerose múltipla) leva a redução da secreção de TNF- α de maneira dose dependente.

Descrita pela primeira vez como um fator de diferenciação de células B, a IL-6 é multifuncional e regula a resposta imune, hematopoiese, resposta de fase aguda e inflamação (MIHARA *et al*, 2012). Quase todas as células estromais e imunes podem produzir IL-6 e seus principais indutores são o TNF- α e a IL-1 β , embora outras vias, como sinalização por TLR, também estejam envolvidas com a sua produção (HUNTER e JONES, 2015). Em contrapartida, nível sérico elevado de IL-6 tem sido relacionado ao desenvolvimento de doenças inflamatórias como artrite reumatoide e Doença de Crohn (RINCON, 2012).

A IL-6 age na polarização da resposta imune adaptativa, uma vez que ela promove a mudança do perfil T_H1 para T_H2 por induzir o aumento da produção de IL-4 e de supressores da sinalização de IFN- γ (SOCS1 ou SOCS3). Além disso, em ação conjunta com TGF- β , a IL-6 promove diferenciação de células T_H17, produtoras de IL-17, levando ao acúmulo de neutrófilos. IL-6 também é conhecida por bloquear a atividade de células Tregs e induzir a produção de anticorpos por células B

(SCHELLER *et al*, 2011). E, por fim, IL-6 tem sido implicada no desenvolvimento e metástase de vários tipos de neoplasias (câncer de próstata, carcinoma de células renais e mieloma múltiplo) (MIHARA *et al*, 2012).

A produção de IL-6 é bem descrita no mieloma múltiplo, permitindo a adesão de células tumorais ao estroma da medula óssea e levando ao crescimento e sobrevivência dessas células (CALLIGARIS-CAPPIO *et al*, 1991). Em co-cultura de células estromais da medula óssea e células de mieloma múltiplo, o tratamento com talidomida causou redução dos níveis de VEGF e IL-6 (GUPTA *et al*, 2011). Além disso, cultura de PBMC humano estimulado com PHA e tratado com talidomida, tem os níveis de IL-6 reduzidos (ROWLAND *et al*, 1998).

A resposta imune envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias com o objetivo de defender o hospedeiro de patógenos. Entretanto, uma ativação excessiva da inflamação pode dar origem a distúrbios metabólicos e hemodinâmicos, prejudiciais ao hospedeiro. Desta forma, um importante sistema regulador das respostas imunes é representado pela ação da citocina IL-10 (LYER e CHENG, 2012).

A IL-10 foi primeiramente descrita como citocina específica de células T_H2 , porém, evidências posteriores mostraram que sua produção era associada a um subtipo de células T, com atividades imunomodulatórias, as células Treg (GRAHAM *et al*, 2013). Porém, hoje é sabido que a IL-10 pode ser expressa em células da imunidade adaptativa como células T_H1 , T_H2 , T_H17 , Treg, células $TCD8^+$ e células da imunidade inata como macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, mastócitos, células *Natural killer* (NK) e neutrófilos (SARAIVA e GERRA, 2010). Além dessas fontes de IL-10, recentemente tem ganhado destaque um subtipo de células B produtoras de IL-10, as B10, assim denominadas para diferenciá-las como um subtipo de células B cuja única função é a produção desta citocina (KALAMPOKIS *et al*, 2013).

A IL-10 pode inibir a ativação de células T de forma indireta, pela supressão da função de células apresentadoras de antígeno, ou de forma direta, pela supressão da produção de IL-2 e sinalização por CD28, prejudicando a proliferação e sobrevivência de linfócitos T (GRÜTZ, 2005). Os mecanismos moleculares desencadeados pela ligação de IL-10 aos seus receptores, IL-10R1 e IL-10R2 incluem: 1) ativação de STAT3 que, por sua vez, ativa o supressor de sinalização de citocinas SOCS3, exercendo atividade regulatória sobre diversas

citocinas; 2) inibição da fosforilação de I κ B, mantendo NF- κ B retido no citoplasma, na sua forma inativa; 3) outras possibilidades que incluem inibição de MAPK e/ou ativação de via inibitória PI3K/Akt (MOSSER e ZHANG, 2008).

Uma consequência da disfunção do sistema IL-10 é o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e doenças inflamatórias intestinais. Em contrapartida, a superprodução de IL-10 pode inibir respostas imunes a diversos patógenos, possibilitando a progressão de infecções e ocorrência do choque séptico (LYER e CHENG, 2012).

A atividade da talidomida sobre a IL-10 é bastante variável, tanto podendo não interferir com a produção da citocina (ROWLAND *et al*, 1999), quanto elevá-la, como relatam Shannon *et al* (2008) em seu estudo utilizando PBMC humano estimulado com PHA e tratado com concentrações crescentes de talidomida.

As quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas por diversas células e possuem atividade pleiotrópica numa ampla gama de atividades biológicas como imunidade, angiogênese metástase de diversos tipos de neoplasias (Vazirinejad *et al*, 2014). Estudos mostram a capacidade da talidomida em reduzir a produção de quimiocinas como CXCL-10 e IL-8 (YANG *et al*, 2015; YE *et al*, 2006; MAZZOCCOLI *et al*, 2012).

A CXCL-10 é secretada em resposta a estímulos como IFN- γ e lipopolissacarídeo (LPS) e exerce sua atividade pela ligação ao receptor CXCR3 promovendo, dentre outras atividades, quimiotaxia de macrófagos, monócitos, linfócitos T_{H1} e células NK ativadas, modulação do desenvolvimento e função de linfócitos T, estímulo à adesão de linfócitos T às células endoteliais e atividade anti-angiogênica (MANOUSOU *et al*, 2008; VAZIRINEJAD *et al*, 2014). Artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e esclerose múltipla são exemplos de distúrbios inflamatórios e autoimunes que cursam com aumento do número de células expressando o receptor CXCR3 (SINGH *et al*, 2015; MANOUSOU *et al*, 2008).

A IL-8 é uma quimiocina conhecida pelo recrutamento e ativação de neutrófilos para o sítio de inflamação, apesar de ter como alvo de ação, uma ampla variedade de células, além dos neutrófilos. Seu mecanismo de ação depende da sua ligação a dois receptores: CXCR1 e CXCR2 presentes em granulócitos, monócitos, mastócitos e células NK (LIU *et al*, 2016). Outras células, além dos leucócitos, expressam CXCR1/2, como por exemplo, células endoteliais, melanócitos e células

epiteliais e nestas células, a sinalização por IL-8 pode contribuir para angiogênese e crescimento tumoral (RUSSO *et al*, 2014).

De fato, a elevada produção de IL-8 pelas células epiteliais intestinais é um fator envolvido na patogenia das doenças inflamatórias intestinais (SINGH *et al*, 2015; ROGLER e ANDUS, 1998). Além disso, a IL-8 promove diversas atividades relevantes na biologia tumoral, como aumento da proliferação, sobrevivência e indução da migração de células endoteliais e tumorais, além de infiltração de neutrófilos nos sítios tumorais (RUSSO *et al*, 2014).

Embora a interferência na atividade do NF- κ B seja um mecanismo inibitório sobre as citocinas, amplamente descrito na literatura, estudos sugerem que a talidomida também pode exercer seu efeito imunomodulatório por um mecanismo independente de NF- κ B (KEIFER *et al*, 2001; SAMPAIO *et al*, 2006), como por exemplo, aumentar a degradação do mRNA para TNF- α reduzindo, desta forma, a sua meia vida de 45 minutos para 25 minutos (KIM *et al*, 2004). Em um estudo desenvolvido por Turk, Jiang e Liu (1996), foi possível observar que a talidomida pode se ligar a glicoproteína ácida α -1, pertence à família das proteínas de fase aguda, aumentando sua atividade imunomodulatória sobre o TNF- α .

Outros mecanismos imunomodulatórios da talidomida incluem a supressão de ICAM-1 (LIN *et al*, 2006), regulação de linfócitos auxiliares com aumento da produção de linfócitos T_H2 (BORGES E FRÖEHLICH, 2003), diminuição da produção de IFN- γ e aumento da produção de IL-4 (DIAMANTI *et al*, 2015) e IL-5 por células mononucleares (CALABRESE e FLEISCHER, 1999). Além disso, a redução da expressão de integrina α V β 3, TNF- α , fator de crescimento de fibroblastos (FGF β) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) estão relacionados ao efeito anti-angiogênico da talidomida (SAMPALIO *et al*, 2006) (Figura 3).

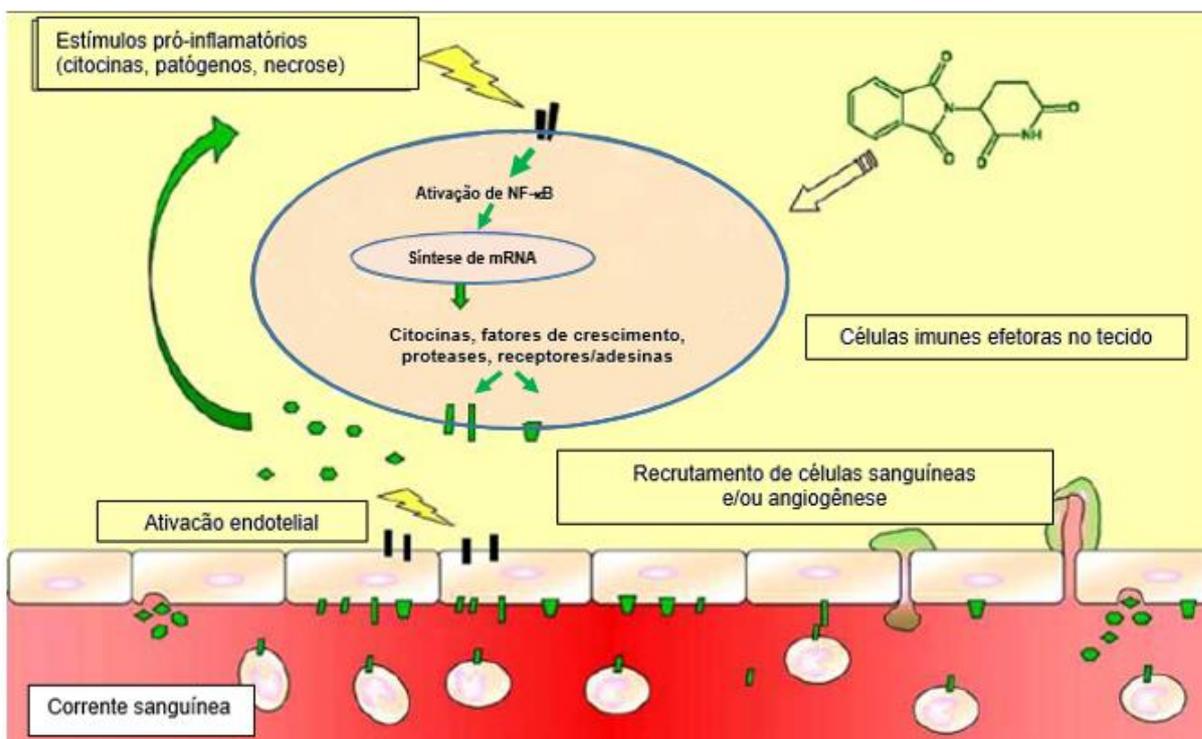


Figura 3 Mecanismos de ação da talidomida: inibe a ativação de NF- κ B e transcrição de alguns genes, resultando em diminuição da expressão de citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão (setas e elementos verdes), menor migração celular e angiogênese. Adaptado de Sampaio *et al* (2006).

1.4 Toxicidade e teratogenicidade da talidomida

Os efeitos colaterais do uso da talidomida são, na maioria das vezes, dose e tempo dependentes, e podem variar de sonolência até a neuropatia periférica caracterizada por sintomas sensoriais como hipo e hiperestesia, diminuição da sensibilidade térmica e da função de nervos autonômicos. Com exceção deste último, os efeitos colaterais se resolvem com descontinuação do tratamento. (SAMPAIO *et al*, 2006).

A talidomida é teratogênica e, por isso, seu uso deve ser criterioso em mulheres que se apresentam em idade reprodutiva (SAMPAIO *et al*, 2006). Uma ampla gama de malformações foi observada ao longo dos anos como defeitos no desenvolvimento de membros, gerando amelia ou focomelia, malformações em ouvidos, olhos (glaucoma e microftalmia, por exemplo), alterações renais, intestinais e cardiovasculares, defeitos na função de nervos cranianos, até malformação

cardíaca, geralmente fatal, gerando uma taxa de mortalidade de bebês recém-nascidos em torno de 40% (ITO *et al*, 2011).

O mecanismo teratogênico da talidomida ainda é objeto de investigação por diversos grupos de pesquisa. Os diferentes processos farmacocinéticos entre as espécies são fatores complicadores no entendimento de tal mecanismo (LIMA *et al*, 2000). Dentre as hipóteses acerca do mecanismo teratogênico, está a formação de espécies reativas de oxigênio induzida pela droga o que levaria a ativação aberrante de NF- κ B que, por sua vez, atenuaria a expressão de dois fatores de crescimento essenciais a formação de membros, o *Fgf8* e *Fgf10*. Também faz parte das hipóteses do mecanismo teratogênico, o seu efeito anti-angiogênico (ITO *et al*, 2011).

1.5 Talidomida no Brasil

Apesar de ter sido retirada do mercado em âmbito mundial, no Brasil, a talidomida continuou sendo comercializada indiscriminadamente até meados da década de 60 e, após inquérito, buscando o número de vítimas do uso da talidomida, o governo brasileiro assumiu a responsabilidade e sancionou a lei 7.070 de 1982, que garante pensão vitalícia e outros direitos às vítimas, como por exemplo, prioridade no fornecimento de aparelhos de prótese e intervenções cirúrgicas.

Na década de 90 foi fundada a Associação Brasileira do Portadores da Síndrome da Talidomida (ABPST). A portaria 160/97 da Secretaria de Vigilância Sanitária, determina as condições de produção e uso da talidomida no Brasil. Assim, nesta portaria, fica estabelecido que a sua produção fica restrita a laboratórios oficiais, sua comercialização se mantém proibida, sendo sua distribuição restrita ao Sistema Único de Saúde e, por último, mantém-se a proibição do uso por mulheres em idade de gestação (da menarca à menopausa), salvo em condições onde o risco/benefício já fora avaliado sendo obrigatório à mulher, neste caso, assinar um termo de comprometimento quanto às medidas contraceptivas (OLIVEIRA *et al*, 1999).

Esta portaria também determina as indicações do uso da talidomida no Brasil, sendo indicado para tratamento de eritema nodoso leproso, que acomete pacientes com Hanseníase, enfermidades relacionadas a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), por melhoras desses pacientes como redução da febre e ganho de peso, doenças inflamatórias crônicas e degenerativas, como as doenças inflamatórias intestinais. O paciente recebe junto com o medicamento um Termo de Esclarecimento e de Responsabilidade (BORGES e FRÖEHLICH, 2003).

1.6 Compostos análogos da talidomida

Frente às propriedades farmacológicas da talidomida e os efeitos colaterais, por vezes graves e irreversíveis, o que limita seu uso, a busca de novos análogos que permitam boas respostas terapêuticas com mínimos efeitos colaterais e melhor solubilidade em meio aquoso, tem ganhado importância no meio científico (MARRIOTT *et al.*, 1998).

Pesquisas iniciais sobre a síntese de análogos da talidomida, visaram caracterizar os grupamentos responsáveis pela sua atividade farmacológica. Para isso, foram feitas diversas substituições nos grupos ftalimida e glutarimida (LIMA *et al.*, 2001). Estudos feitos por Miyachi e colaboradores (1997, citado por LIMA *et al.*, 2001) e corroborados pelos estudos de Muller e colaboradores (1999) demonstram a importância do grupamento ftalimida, já que modificações nessa unidade alteram a atividade anti-TNF- α (LIMA *et al.*, 2001).

Ao estudar a atividade de produtos metabolizados da talidomida em células humanas THP-1, Nakamura e colaboradores (2006) constataram que os compostos que apresentam grupo ftalimida ou glutarimida ou ambos abertos, podem ter atividade aumentada sobre TNF- α . Esses resultados corroboram o trabalho de Corral e colaboradores (1999) que já haviam demonstrado atividade inibitória de análogos ftalimidicos abertos, sobre a produção de TNF- α , IL-12 e IL-1 β , em monócitos humanos (COSTA, 2013).

Diaminas e poliaminas exercem importantes papéis em processos biológicos e tem diferentes efeitos farmacológicos (CASERO e WOSTER, 2001). Muller *et al* (1996) constataram que análogos ftalimídicos contendo grupamento NO₂ apresentam elevada atividade sobre TNF- α , IL-1 β e IL-12.

Tabela 1 Pesquisa e desenvolvimento de análogos da talidomida ao longo dos anos.

Miyachi e colaboradores (1997) Muller e colaboradores (1999)	Modificações na unidade ftalimida alteram a atividade anti-TNF- α
Nakamura e colaboradores (2006) Corral e colaboradores (1999)	Unidade ftalimida ou glutarimida ou ambas abertas - \uparrow atividade inibitória sobre TNF- α , IL-12 e IL-1 β
Muller <i>et al</i> (1996)	Análogos ftalimídicos contendo grupamento NO ₂ . \uparrow atividade sobre TNF- α , IL-1 β e IL-12
ALMEIDA <i>et al</i> (2007) Thalidomide analogs from diamines: synthesis and evaluation as inhibitors of TNF-alpha production	14 compostos análogos testados quanto a atividade anti-TNF-alpha em PBMC humanos estimulados por LPS
MAZZOCCOLI <i>et al</i> (2012) Novel thalidomide analogues from diamines inhibit pro-inflammatory cytokine production and CD80 expression while enhancing IL-10	9 compostos análogos testados em J774A.1 (murino) e PBMC (humano) - Destaque GI-16 e SC-15
COSTA (2013) Avaliação da Atividade Antiinflamatória e Toxicidade Aguda e Sub-Crônica <i>in vivo</i> de Análogos da Talidomida Contendo Diaminas e Estrutura Ftalimídica Aberta	GI-16 e SC-15 testados <i>in vivo</i>

Em estudo anterior, uma série de análogos da talidomida contendo diaminas e estrutura ftalimida aberta foram sintetizados no Laboratório de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), objetivando obter compostos com maior solubilidade em água e melhor atividade antiinflamatória. Esses compostos formados por unidades ftalimídicas não hidrolisadas, contendo diaminas ou poliaminas entre as duas subunidades ftalimídicas, foram avaliados por Almeida *et al* (2007) quanto a capacidade de inibir a produção de TNF- α em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) estimuladas com LPS. Foi observado que a introdução de dois anidridos ftálicos abertos aumentou significativamente a atividade biológica assim como a solubilidade em água dos compostos estudados (ALMEIDA *et al*, 2007).

Em 2012, Mazzoccoli *et al*, avaliaram a atividade de 9 desses análogos em cultura de células J774 A.1 (murinas) e PBMC (humano) estimuladas por LPS e IFN- γ e mostraram que os compostos contendo diaminas e estrutura ftalimídica aberta são capazes de inibir *in vitro* a produção de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-12, IL-6, IFN- γ , CXCL-9, CXCL-10 e expressão de CD80, além de elevar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, com destaque para os compostos GI-16 e SC-15.

Os compostos GI-16 e SC-15 foram testados, posteriormente, por Costa e colaboradores (2013) quanto a atividade anti-inflamatória *in vivo* e toxicidade aguda e sub-crônica, utilizando um modelo de edema de pata e inflamação pulmonar em camundongos, e estudos de toxicidade em ratos. Esses compostos se mostraram promissores, por não apresentarem toxicidade e demonstrarem elevada atividade anti-inflamatória.

Portanto, visando dar continuidade às pesquisas envolvendo os análogos GI-16 e SC-15, o objetivo inicial desse trabalho foi avaliar a atividade biológica desses compostos em modelo de doença inflamatória intestinal *in vitro*, utilizando linhagem de célula epitelial intestinal, derivada de adenocarcinoma colorretal humano, HT-29. Para isso, inicialmente foi feita espectrometria de massa dos compostos GI-16 e SC-15, afim de garantir a sua pureza e, para nossa surpresa, após o longo período em que foram armazenados em nosso laboratório, os compostos não apresentavam mais a estrutura química e o peso molecular iniciais.

Avaliando os novos compostos apresentados, constatamos serem simplificados pela presença de apenas um anidrido ftálico aberto e peso molecular consideravelmente mais baixo que os análogos originais, GI-16 e SC-15, o que melhora a solubilidade em água e sua biodisponibilidade, além de redução do custo de produção. Além disso, esses novos compostos mantem características importantes dos análogos GI-16 e SC-15 como a ausência de centro quiral, susceptível a racemização, como ocorre na talidomida, o que pode reduzir potencialmente a ocorrência de efeitos colaterais (LIMA *et al*, 2001) e a presença do grupo nitro em apenas um dos compostos.

Frente às possíveis vantagens, acima expostas e pelo fato de que é razoável pensar que essas novas estruturas simplificadas poderiam ser metabólitos dos compostos com dois anidridos ftálicos abertos, GI-16 e SC-15, decidimos, então, avaliar a atividade anti-inflamatória destes novos análogos da talidomida, que foram

nomeados como CAT-15 e CAT-16 (Figura 4), utilizando cultura de células HT-29 e células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). Para essa finalidade, foram sintetizados maiores volumes dos novos compostos, pelo laboratório de química da UFJF, conforme a nova estrutura molecular.

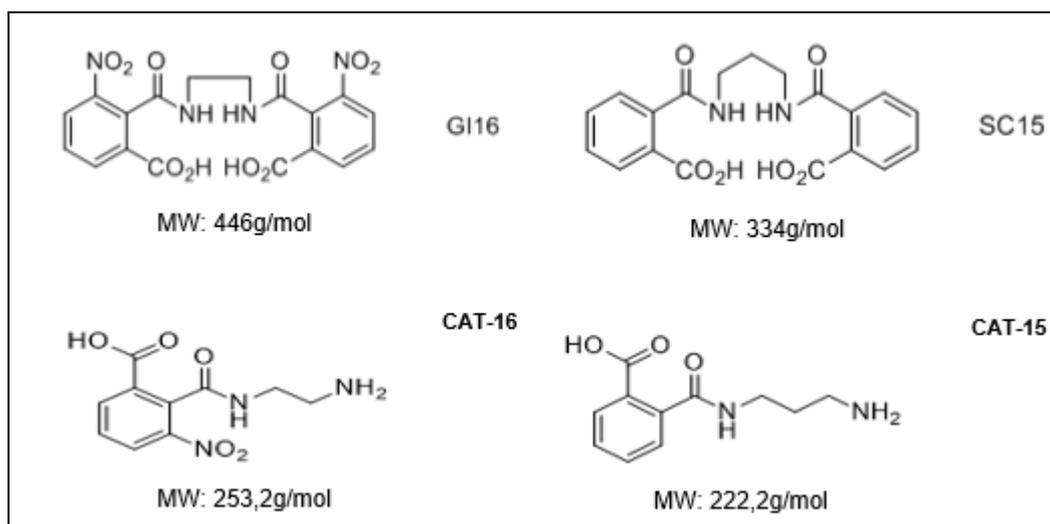


Figura 4 Estrutura e peso molecular dos compostos originais, GI-16 e SC-15 (imagem superior) e dos novos compostos CAT-15 e CAT-16 (imagem inferior).

1.7 Modelos de inflamação *in vitro*

1.7.1 Características das células HT-29 e sua importância na pesquisa sobre fármacos

O uso de linhagens de células epiteliais intestinais tem contribuído para um melhor entendimento sobre a barreira de mucosa, comportamento deste epitélio em situações de inflamação e ainda, é de grande importância, na indústria farmacêutica, para determinação de permeabilidade e toxicidade de fármacos (GÜLL *et al*, 2009).

A linhagem de células HT-29 possui morfologia de célula epitelial e foi estabelecida em 1964 a partir de adenocarcinoma colorretal humano (figura 5). São

aderentes e capazes de induzir tumores em camundongos nude (FOGH e TREMPE, 1975). Apresentam em suas características ultraestruturais microvilosidades, microfilamentos, mitocôndria com grandes vacúolos e grânulos escuros, retículo endoplasmático liso e rugoso com ribossomos livres, corpúsculos lipídicos, poucos lisossomos primários e diversos lisossomos secundários (www.atcc.org/products/all/HTB-38.aspx).

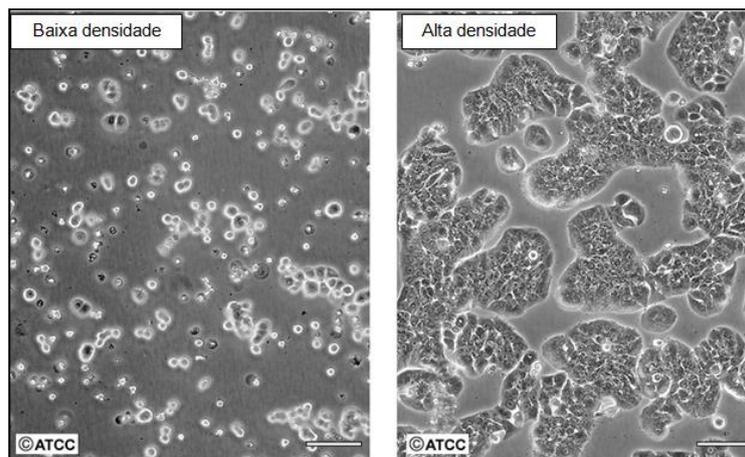


Figura 5 Fotomicrografia das células da linhagem HT-29 em baixa densidade (esquerda) e alta densidade (direita). (adaptado de atcc.org/products/all/HTB-38).

As células HT-29 possuem como características seu alto consumo de glicose e produção de ácido láctico (ROUSSET, 1986). O interesse sobre essa linhagem celular é a capacidade de obtenção de uma cultura de células indiferenciadas, pluripotentes e não polarizadas e de células diferenciadas e polarizadas, dependendo das condições do meio de cultura. (CHASTRE *et al*, 1985). A diferenciação dessas células pode ocorrer em resposta a indutores de diferenciação, (ex.: butirato), ou de forma espontânea, após atingida a confluência na cultura e na ausência/escassez da glicose (LE BIVIC *et al*, 1988).

Quando em seu estágio indiferenciado, as células HT-29 apresentam morfologia e fisiologia de células epiteliais das criptas intestinais e quando se diferenciam, de forma espontânea ou não, sua morfologia e fisiologia se assemelha a células epiteliais localizadas na superfície das vilosidades intestinais, local onde geralmente não ocorre contato com a microbiota intestinal (ROUSSET, 1986).

Diversos mediadores inflamatórios e padrões moleculares purificados de patógenos conhecidos, dentre eles, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e LPS são utilizados como estímulo para síntese de mediadores inflamatórios em culturas de células HT-29 e sua resposta ao LPS está relacionada ao seu estado de diferenciação, que influencia a expressão de TLR4 nestas células (ROUSSET, 1986).

O estado de sub-confluência é relatado por Leibovitz *et al* (1976) como ideal para a resposta de células HT-29 à diversos estímulos inflamatórios e o trabalho de Lee *et al* (2005), reforça essa ideia, mostrando uma resposta ao estímulo por LPS inversamente proporcional ao tempo de cultivo em confluência total. Portanto, buscamos estabelecer condições de cultura em que as células HT-29 permanecessem em estado de sub-confluência (Apêndice A e Figura 23) e consequentemente indiferenciadas para o sucesso da resposta ao nosso indutor de inflamação, o LPS (Apêndice B e Figura 24).

1.7.2 Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC humano)

O sangue periférico é a principal fonte de células linfóides e mielóides para investigação do sistema imunológico em humanos. O perfil de citocinas produzidas por PBMC em resposta ao LPS já tem sido bem caracterizado na literatura (CAVAILLON *et al*, 1990; FLEGEL *et al*, 1989). Siednienko e Miggin (2009), em seu estudo sobre a expressão basal de TLRs em PBMC, mostram que essas células expressam diversos receptores do tipo Toll (TLR1 a TLR10) o que justifica sua ampla utilização no meio científico para estudo do funcionamento e ativação do sistema imune inato.

Quando estimuladas com LPS, as PBMC produzem grandes quantidades de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ e IL-10 (JANSKÝ *et al*, 2003). Portanto, esse trabalho visa desenvolver a síntese e avaliar a atividade biológica de dois novos compostos análogos da talidomida, CAT-15 e CAT-16, envolvendo o estudo da produção de citocinas pró-inflamatórias em células HT-29 e PBMC humano, frente ao estímulo com LPS. O trabalho busca a obtenção de compostos com maior solubilidade e efeito anti-inflamatório, com potencial para desenvolvimento de novas opções terapêuticas para as desordens inflamatórias.

1.7.3 LPS e sua atividade pró-inflamatória

O LPS é o principal componente da parede celular de bactérias Gram-negativas e o principal receptor para sua sinalização nas células de mamíferos é o complexo TLR4-MD2 (LEE *et al*, 2005). A primeira proteína a reconhecer o LPS é a proteína de ligação ao LPS (LBP), uma proteína de fase aguda, responsável por formar um complexo ternário com CD14 e desta forma, apresentar o LPS ao complexo receptor TLR4-MD2 (ZANONI *et al*, 2012).

MD2 é uma glicoproteína associada ao TLR4 e essencial a sinalização do LPS, uma vez que, permite a dimerização do complexo TLR4-MD2 (RAJIAH *et al*, 2015). A resposta mediada por esse complexo pode ser dividida em duas categorias: uma resposta rápida, mediada pela proteína adaptadora MyD88 (*Myeloid differentiaton primary-response protein 88*) e uma resposta lenta, independente de MyD88, mediada por TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) (PALSSON-MCDERMOTT e O'NEILL, 2004).

A sinalização mediada por MyD88 ocorre principalmente na membrana plasmática e envolve a fosforilação de cinases e cascata de ativação do fator de transcrição Fator Nuclear- κ B (NF- κ B), que se transloca ao núcleo e se liga a sítios responsivos do DNA levando a transcrição de genes envolvidos na inflamação (CRUZ-MACHADO, 2010).

Ao contrário, a sinalização mediada por TRIF, em resposta ao LPS, ocorre na membrana endossomal, após a internalização do TLR4, ativando fator regulador de interferon 3 (IRF3), resultando na produção de interferon (IFN) - β , CXCL-10 e outros genes dependentes de IRF3 além da ativação tardia de NF- κ B (RAJIAH *et al*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória da talidomida e de dois novos análogos, CAT-15 e CAT-16, em culturas de células HT-29 e PBMC humano, estimuladas por LPS.

2.2 Objetivos específicos

- Acompanhar a síntese dos compostos CAT-15 e CAT-16.
- Avaliar a toxicidade da talidomida e dos compostos CAT-15 e CAT-16 em cultura de células HT-29 e em culturas de PBMC, utilizando a técnica do MTT.
- Avaliar a produção de TNF- α , IL-6, IL-10, CXCL-10 e IL-8 nos sobrenadantes das culturas de células HT-29 estimuladas com LPS e submetidas ao tratamento simultâneo ou pré-tratamento com talidomida ou com os compostos CAT-16 e CAT-15.
- Avaliar a produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e CXCL-10 nos sobrenadantes das culturas de PBMC submetidas ao pré-tratamento com talidomida ou com os compostos CAT-16 e CAT-15 e estimuladas com LPS por 24 e 48 horas.

3 MATERIAL e MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

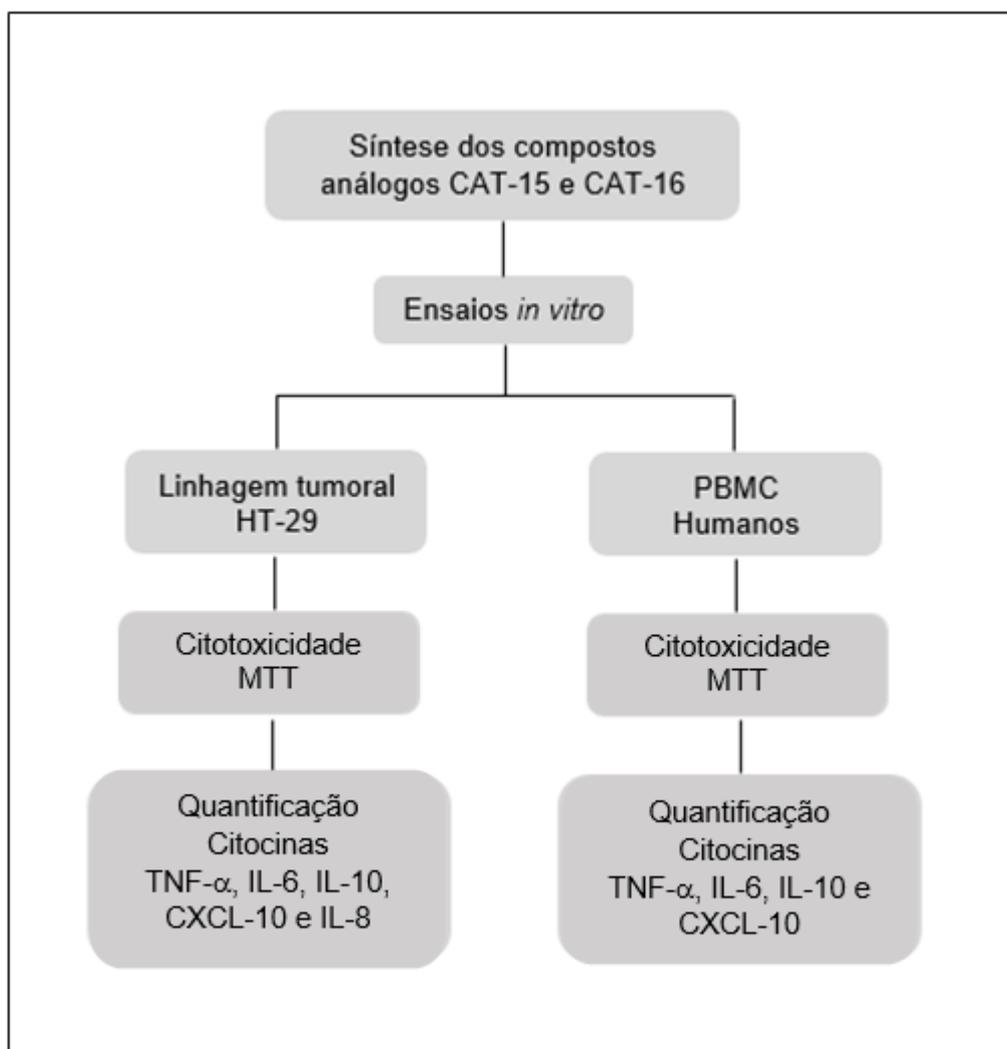


Figura 6 Organograma de planejamento e elaboração dos ensaios propostos no projeto

3.2 Síntese dos análogos CAT-15 e CAT-16

3.2.1 Síntese do análogo CAT-15

A uma solução metanólica contendo 1 equivalente de propanodiamina foram adicionados 1,2 equivalente de uma solução em THF de anidrido ftálico e esta mistura permaneceu em agitação magnética e a temperatura ambiente por 30 min. Após o término da reação o bruto da reação foi filtrado e levado com metanol gelado 3x (15 mL). Após secagem sob pressão reduzida o produto CAT-15 foi obtido como um sólido amorfo com rendimento médio de 94%. O produto foi caracterizado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H ; Figura 7). RMN de ^1H (500 MHz, D_2O): 7,54 (dd, 1 H, $J = 9,3$ Hz, $J = 1$ Hz), 7,45 (td, 1 H, $J = 7,4$ Hz, $J = 1$ Hz), 7,41 (td, 1 H, $J = 7,5$ Hz, $J = 1$ Hz), 7,37-7,35 (m, 1 H), 3,39 (t, 2 H, $J = 6,5$ Hz), 3,05 (t, 2 H, $J = 7,5$ Hz), 1,89 (quint., 2H, $J = 7,3$ Hz).

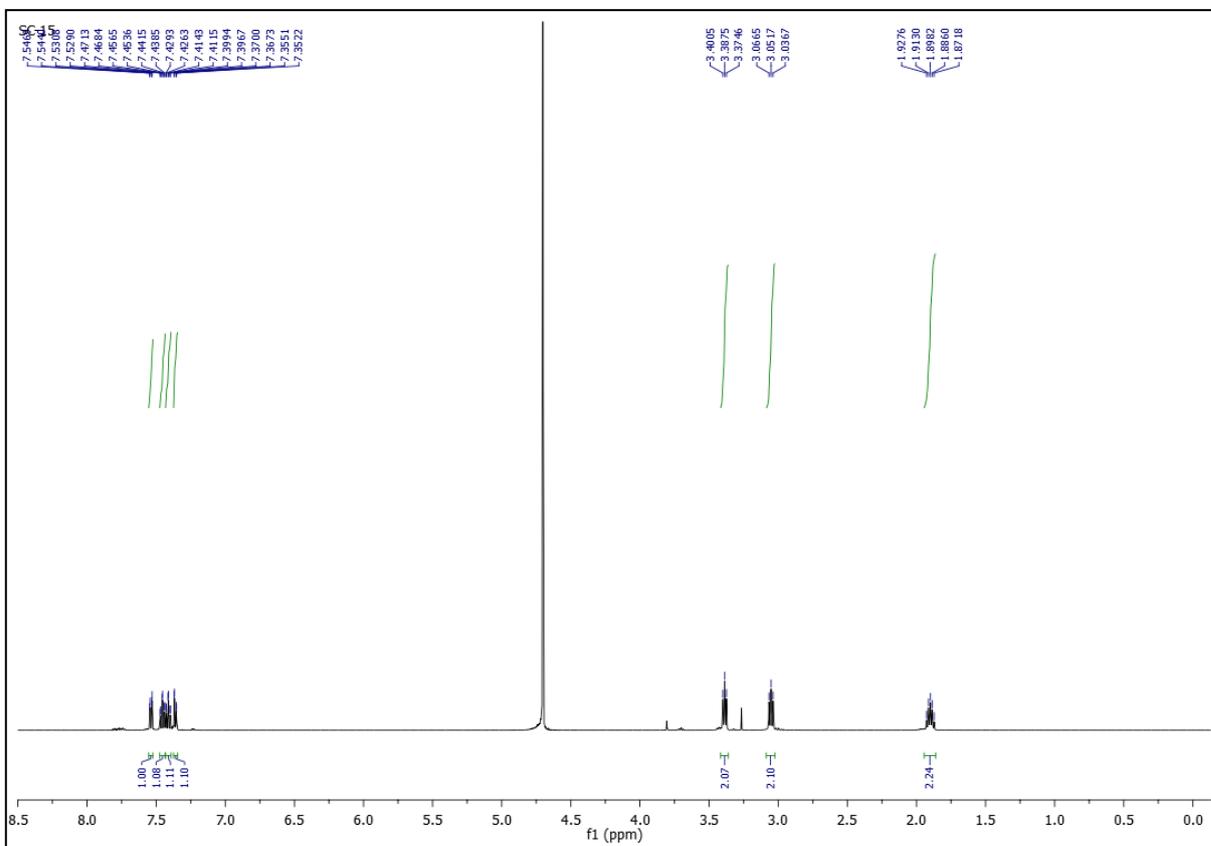


Figura 7 RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) do composto CAT-15.

3.2.2 Síntese do análogo CAT-16

A uma solução metanólica contendo 1 equivalente de etilenodiamina foram adicionados 1,2 equivalente de uma solução em THF de anidrido 3-nitroftálico e esta mistura permaneceu em agitação magnética e a temperatura ambiente por 30 min. Após o término da reação o bruto da reação foi filtrado e levado com metanol gelado 3x (15 mL). Após secagem sob pressão reduzida o produto GI16 foi obtido como um sólido amorfo com rendimento médio de 90%. O produto foi caracterizado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H ; Figura 8). RMN de ^1H (500 MHz, D_2O): 7,92 (dd, 1 H, $J = 8 \text{ Hz}$, $J = 1 \text{ Hz}$), 8,09 (dd, 1 H, $J = 8 \text{ Hz}$, $J = 1 \text{ Hz}$), 7,53 (t, 1 H, $J = 8 \text{ Hz}$), 3,38 (s, 4 H).

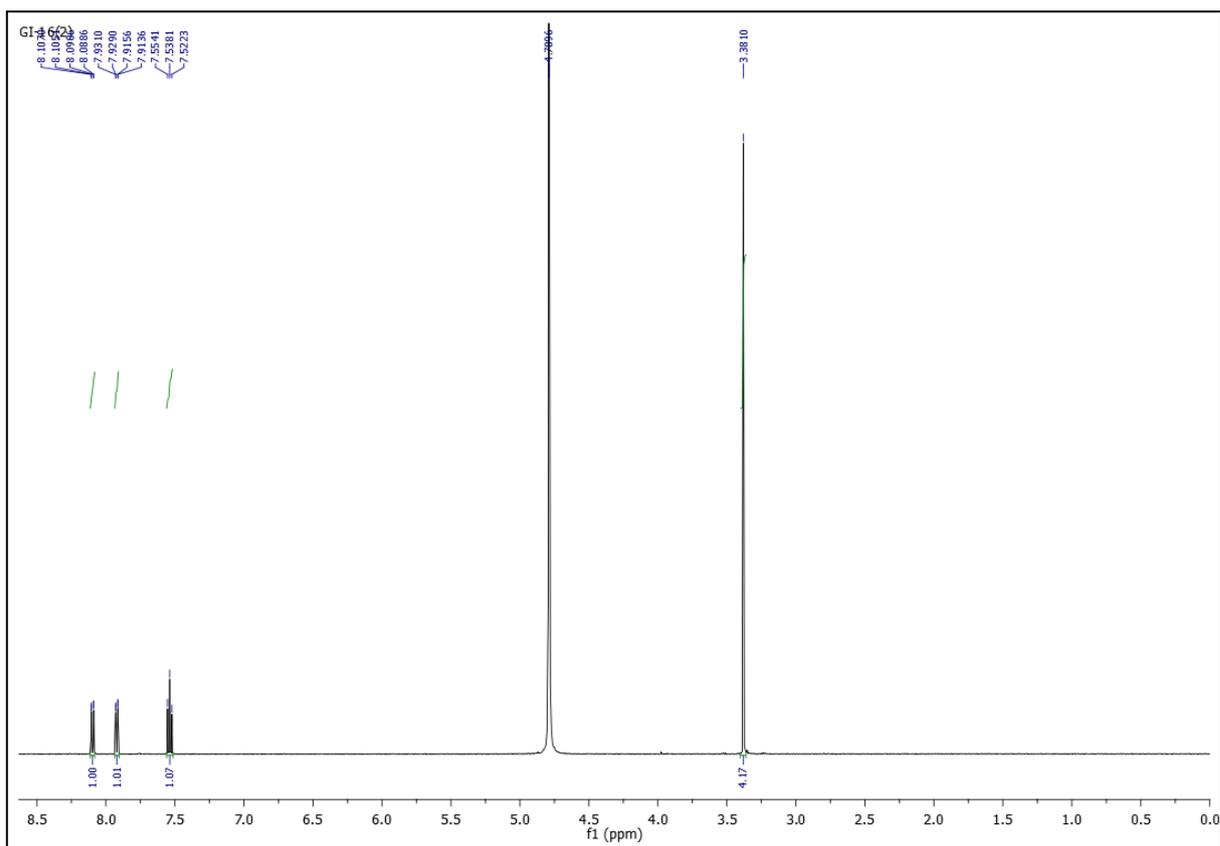


Figura 8 RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) do composto CAT-16

3.3 Cultura de células HT-29

As células HT-29 foram cultivadas em meio DMEM com alta concentração de glicose (4,5 g/L) (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®), 1% de L-glutamina (Gibco®) e 1% de antibiótico (penicilina 100UI/ml e estreptomicina 100µg/ml - Gibco®), em garrafas de 75cm² (Sarstedt®). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂. O meio foi trocado todos os dias e os repiques feitos quando as células alcançavam o mínimo de 80% de confluência em cultura. O meio de cultivo foi aspirado e descartado, as células foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) estéril para remoção de soro fetal bovino residual e debris celulares e, em seguida, isoladas com 8 ml de uma solução de tripsina (0,25%) e EDTA (1mM) (Sigma®) em incubadora a 37°C por 3 minutos. Em seguida, as células, foram centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) e o pellet ressuscitado em meio para a contagem em câmara de Neubauer, utilizando Trypan blue. As células foram mantidas em placas de cultura por 7 dias antes dos experimentos.

3.4 Obtenção do PBMC

Para obtenção do PBMC foram coletados cerca de 30 ml de sangue periférico, por punção venosa, de indivíduos saudáveis, em tubos heparinizados. O sangue então foi transferido para tubos cônicos de 50ml e diluídos com PBS estéril (diluição 1:2). Em seguida, o sangue diluído foi transferido para tubos cônicos de 50ml contendo, no fundo, 10ml de Ficoll-Plaque™ Plus (GE-Healthcare densidade 1.077 +/- 0,001g/mL). O material foi centrifugado a 1600rpm, por 20 minutos, a 15°C e a camada de células mononucleares formada foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril. O produto obtido foi lavado duas vezes em meio RPMI 1640 (Gibco®), com centrifugações a velocidades decrescentes (1500rpm e 1300rpm), por 10 minutos cada e a 4°C. O pellet celular foi, em seguida, ressuscitado em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®), 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco®), 1% de penicilina e

estreptomicina (Gibco®) e 2nM de L-glutamina (Gibco®). As células foram contadas, sendo ajustada a sua concentração e avaliada a sua viabilidade em câmara de Neubauer, utilizando Trypan blue. Em seguida, as células foram imediatamente plaqueadas e ensaiadas.

3.5 Avaliação da viabilidade celular pela técnica de MTT para as células HT-29

O ensaio de MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) baseia-se na medida do dano induzido às células pelo composto em estudo através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. As células viáveis, ou seja, metabolicamente ativas, reduzem o MTT (sal de coloração amarelada, e solúvel em água) em formazan, sal de colocação arroxeadada e insolúvel em água formando pequenos cristais que são solubilizados pelo uso de DMSO (dimetilsulfóxido) (OLIVEIRA, 2009). As células HT-29 foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de 2×10^4 células.mL⁻¹ e incubadas por 24 horas.

A talidomida foi obtida da Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte, MG). Devido a sua baixa solubilidade em água, essa droga é, frequentemente, dissolvida em DMSO para fins experimentais. Desta forma, a fim de avaliar a sua melhor diluição, assegurando viabilidade celular, as células foram tratadas com DMSO 100%, diluído até as concentrações finais de 0,2%, 0,1% e 0,01%. Após estabelecimento da melhor diluição do DMSO, as células foram tratadas com talidomida, CAT-15 e CAT-16 em várias concentrações (100µM, 400µM, 800µM e 1600µM), e, de acordo com estudo de Sunil, Ramadori e Raddatz (2010), a dexametasona (Sigma®) foi utilizada na concentração de 1µM.

Tanto para avaliação da melhor diluição de DMSO, quanto para avaliação da viabilidade celular frente as drogas teste, o período de incubação foi de 18 horas. Após esse período, se procedeu a técnica do MTT, da seguinte maneira: 10µl de uma solução de MTT a 5 mg.mL⁻¹ foram adicionados a cada poço e incubadas por mais 4 horas. O meio então foi removido e adicionado 100µl de DMSO a cada poço para solubilização dos cristais de formazan. Após a estabilização da cor, as placas foram lidas a 550nm usando leitor de ELISA (Spectramax-190, Molecular Devices).

3.6 Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT para o PBMC

O PBMC foi plaqueado em placas de 96 poços, na concentração de $2,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹ (ROWLAND *et al*, 19998) e tratadas com DMSO a 0,1% (MAZZOCOLLI *et al*, 2012), talidomida, CAT-16 e CAT-15 nas concentrações de 100µM, 200µM, 400µM e 800µM, além da dexametasona a 1µM (ROWLAND *et al*, 1998). Para a avaliação da viabilidade celular frente às drogas teste e ao DMSO, o período de incubação foi de 24 e 48 horas. Após esse período, se procedeu a técnica do MTT, como descrito acima e a leitura das placas foi feita a 550nm usando leitor de ELISA (Spectramax-190, Molecular Devices).

3.7 Determinação da produção de TNF- α , IL-6, IL-10, CXCL-10, IL-8 pelas células HT-29 estimuladas por LPS e tratadas com talidomida, e seus análogos CAT-16 e CAT-15, e dexametasona

As células HT-29 foram semeadas em placas de 24 poços com densidade de 5×10^4 células.mL⁻¹. Ao atingirem sub-confluência (7 dias em cultura), as células foram estimuladas com 250ng.mL⁻¹ de LPS (0111:B4) simultaneamente ou após o pré-tratamento com talidomida, CAT-16 e CAT-15, nas concentrações de 100µM, 400µM, 800µM e 1600µM e dexametasona na concentração de 1µM e incubadas por 18 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Os análogos CAT-16 e CAT-15 foram diluídos em meio DMEM suplementado e a talidomida dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) 100% e posteriormente suspendida em meio DMEM suplementado para formar soluções estoques de 8.8mM. A concentração final de DMSO nas culturas foi de 0,1%. A dexametasona foi diluída também em meio DMEM suplementado formando solução estoque de 0,2mM e adicionada à cultura na concentração de 1µM. Os sobrenadantes foram utilizados para determinação da produção de TNF- α , IL-10, CXCL-10, IL-8 (R&D DuoSet® ELISA) e IL-6 (BD OptEIA™ Set) por meio de ensaio imunoenzimático de acordo com os fabricantes. As placas foram lidas a 450nm usando leitor de ELISA (Spectramax-190, Molecular Devices).

3.8 Determinação da produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e CXCL-10 pelo PBMC estimulado por LPS e tratados com talidomida, e seus análogos CAT-16 E CAT-15 e dexametasona

O PBMC foi semeado em placas de 96 poços com densidade de $2,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹ e estimuladas com 2 μ g.mL⁻¹ de LPS (0111:B4) após o pré-tratamento com talidomida, CAT-16 e CAT-15, nas concentrações de 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M e 800 μ M e dexametasona na concentração de 1 μ M, incubadas por 24 e 48 horas. A diluição dos análogos, talidomida e dexametasona foi similar à acima descrita, formando soluções estoque de 8,8Mm em meio RPMI 1640. Para a dexametasona, a solução estoque foi de 0,2Mm, também de meio RPMI 1640, e a concentração final de DMSO na cultura foi de 0,1%. Os sobrenadantes foram utilizados para determinação, por ensaio imunoenzimático, da produção de TNF- α , IL-10, CXCL-10, (R&D DuoSet® ELISA) e IL-6 (BD OptEIA™ Set) de acordo com os fabricantes. As placas foram lidas a 450nm usando leitor de ELISA (Spectramax-190, Molecular Devices).

3.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas usando o teste ANOVA (one way analysis of variance) no programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) seguido do teste de Tukey como pós-teste. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) e o nível de significância foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade das células HT-29 frente a concentrações crescentes de talidomida, CAT-16 e CAT-15 e a Dexametasona

Devido a sua baixa solubilidade em água, a talidomida foi dissolvida em DMSO 100% para a formação de solução estoque. Inicialmente, buscou-se avaliar a maior diluição do DMSO que assegurasse uma boa solubilidade da droga e adequada viabilidade das células estudadas. Para isso, as células HT-29 foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 células.mL⁻¹ e cultivadas por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. O DMSO foi diluído em meio de cultura suplementado até concentrações finais de 0,2%, 0,1% e 0,01%, com as quais as células foram tratadas por 18 horas, em seguida foi realizado o ensaio de MTT. A viabilidade celular foi estimada pela comparação entre os valores da absorbância obtidos nos poços tratados e os obtidos nos controles (células não tratadas), às quais se admite a viabilidade como 100%. Para todos os ensaios de MTT, foi utilizada a seguintes fórmula:

$$\text{Viabilidade celular relativa (\%)} = \frac{(\text{OD}_{550, \text{amostra}} - \text{OD}_{550, \text{branco}}) \times 100}{(\text{OD}_{550, \text{controle}} - \text{OD}_{550, \text{branco}})}$$

A figura 9 mostra que o DMSO foi bem tolerado pelas células HT-29 nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 0,2% não apresentando diferença significativa em relação a absorbância do grupo controle (não tratado). Desta forma, escolhemos a concentração de DMSO 0,1% para a diluição da talidomida nos experimentos posteriores.

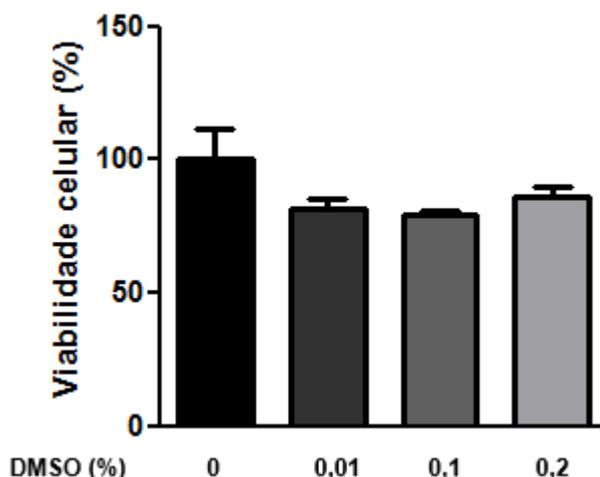


Figura 9 Efeito do tratamento com DMSO nas concentrações 0,01%, 0,1% e 0,2% na viabilidade de células HT-29 pelo ensaio de MTT. Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando teste ANOVA, com teste de Tukey como pós teste.

Em seguida, buscou-se avaliar a tolerância das células HT-29 frente ao tratamento com talidomida, CAT-15, CAT-16 e dexametasona. As células HT-29 foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 células.mL⁻¹, cultivadas por 24 horas e, em seguida, tratadas com concentrações crescentes (100 μ M, 400 μ M, 800 μ M e 1600 μ M) de talidomida, CAT-16 e CAT-15 e 1 μ M de dexametasona por 18 horas, quando foi realizado o ensaio de MTT. A viabilidade celular foi estimada pela comparação entre os valores da absorbância obtidos nos poços tratados com os respectivos compostos e os obtidos nos controles (células não tratadas).

Na figura 10, podemos observar que a talidomida (Figura 10A), o análogo CAT-15 (Figura 10C) e a dexametasona (Figura 10D) foram bem tolerados pelas células HT-29 em todas as concentrações testadas e que, apesar do análogo CAT-16 (Figura 10B) na sua maior concentração testada (1600 μ M), ter provocado redução significativa na viabilidade celular, podemos afirmar que, em geral, os análogos em estudo foram bem tolerados pelas células HT-29.

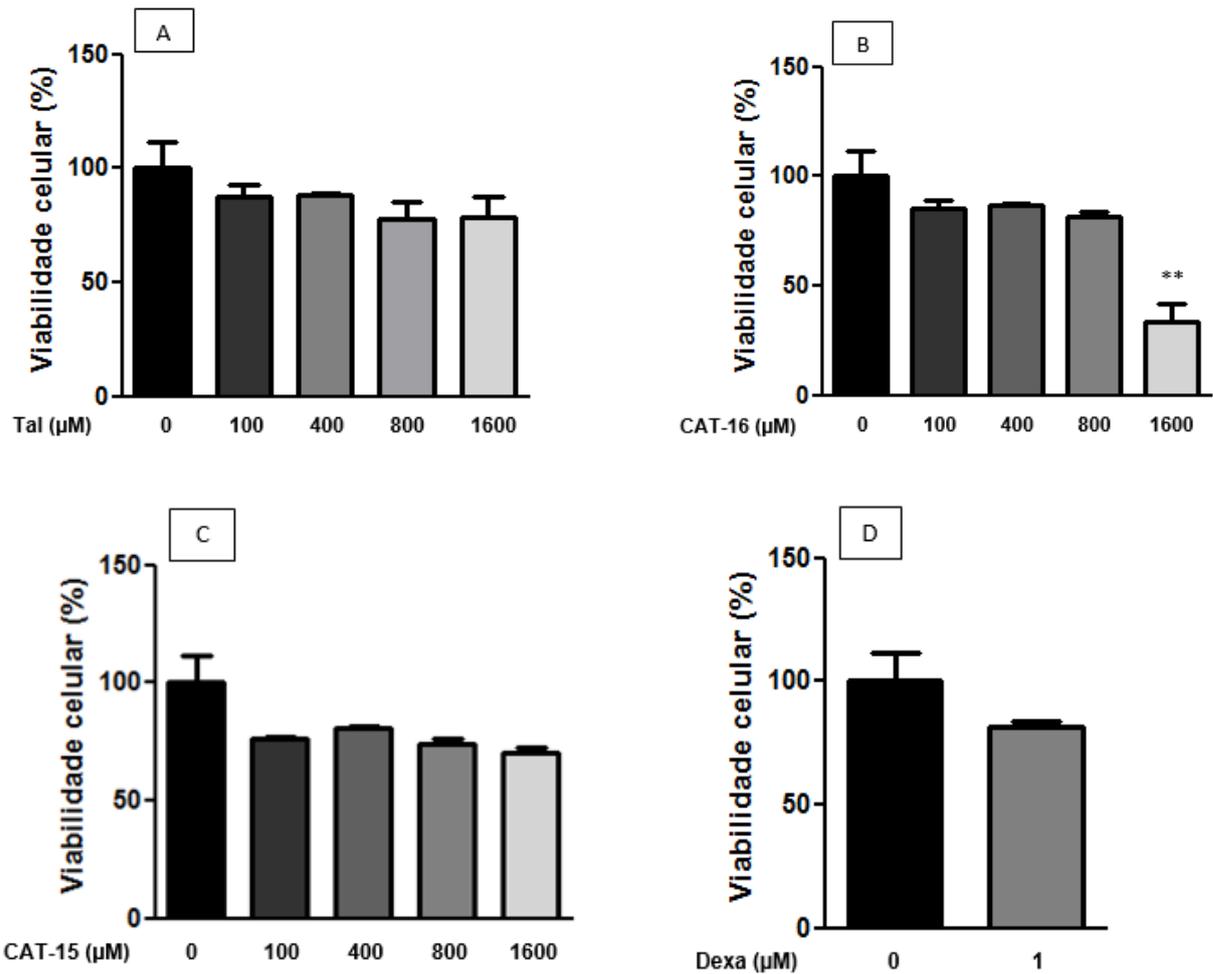


Figura 10 Efeito do tratamento com talidomida (Tal) (A), CAT-16 (B) e CAT-15 (C) nas concentrações de 100, 400, 800 e 1600µM e dexametasona (D) a 1µM na viabilidade de células HT-29 pelo ensaio de MTT. Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando o teste de Tukey como pós teste. ** = $p < 0,01$ versus grupo não tratado.

4.2 Viabilidade do PBMC humano frente a concentrações crescentes de talidomida, CAT-15, CAT-16 e dexametasona

O efeito do tratamento com os compostos CAT-15, CAT-16, talidomida e dexametasona sobre a viabilidade de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) foi avaliado. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de $2,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹, e submetidas ao tratamento imediato com DMSO a 0,1%, talidomida, CAT-16 e CAT-15 nas concentrações de 100µM, 200µM, 400µM e 800µM, além da dexametasona a 1µM. Após o período de incubação de 24 e 48 horas, o ensaio de MTT foi realizado como descrito anteriormente. A viabilidade celular/taxa de proliferação foi estimada pela comparação entre os valores da absorbância obtidos nos poços tratados com os respectivos compostos e os obtidos nos controles (células não tratadas).

Na figura 11, podemos observar que o DMSO foi bem tolerado, na concentração de 0,1%, nos tempos de 24 e 48 horas (Figura 11A e 11B), não interferindo na viabilidade das células. Também podemos observar na figura 12 que talidomida (Figura 12A - 24h; 12B - 48h), CAT-16 (Figura 12C - 24h; 12D - 48h) e CAT-15 (Figura 12E - 24h; 12F - 48h) não foram tóxicos para o PBMC em nenhuma das concentrações e tempos de cultivo testados.

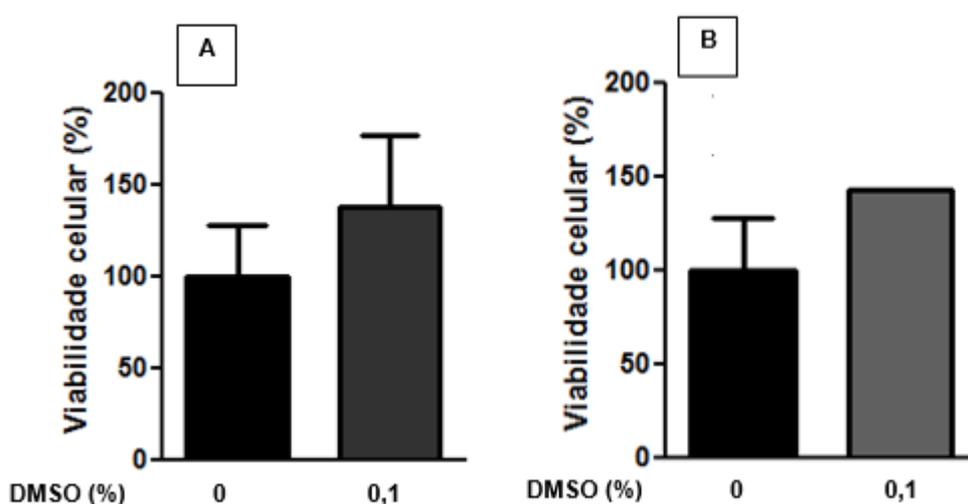


Figura 11 Efeito do tratamento com DMSO na concentração 0,1% na viabilidade de PBMC pelo ensaio de MTT. (A) cultivo de 24 horas, (B) cultivo de 48 horas. Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando teste ANOVA, com teste de Tukey como pós teste.

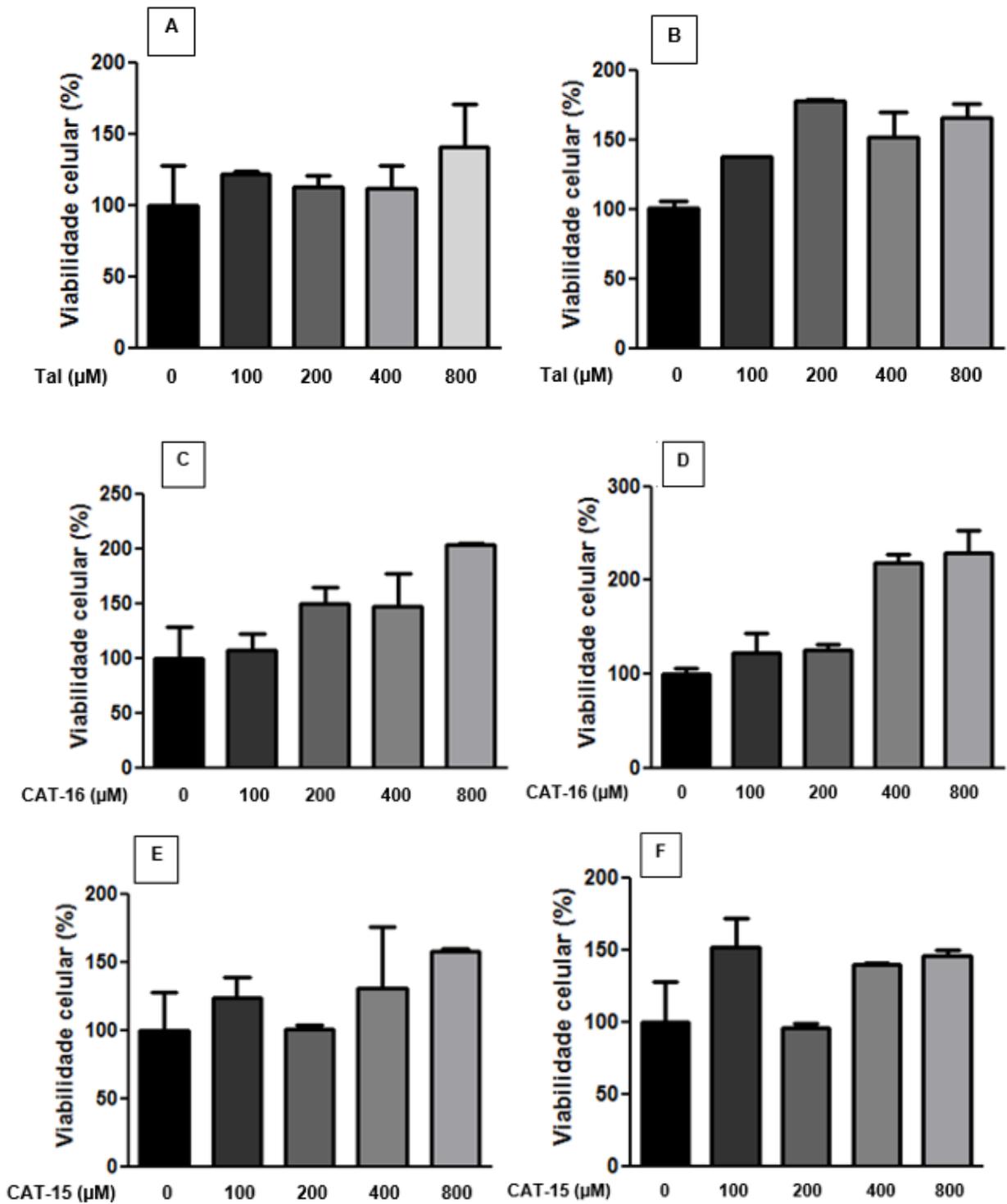


Figura 12 Efeito do tratamento com talidomida (Tal) (A - 24h; B - 48h), CAT-16 (C - 24h; D - 48h) e CAT-15 (E - 24h; F - 48h) nas concentrações de 100, 200, 400 e 800 μM na viabilidade do PBMC humano pelo ensaio do MTT. Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando teste ANOVA, com teste de Tukey como pós-teste.

Da mesma forma, a dexametasona não mostrou toxicidade ao PBMC em nenhum dos tempos de cultivo, na concentração de 1 μ M (Figura 13A - 24h; 13B - 48h).

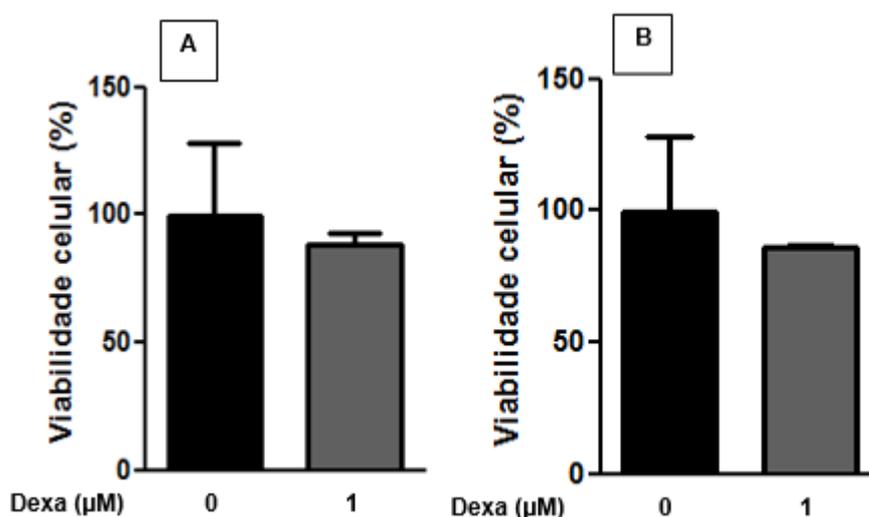


Figura 13 Efeito do tratamento com dexametasona a 1 μ M (A - 24h; B - 48h) na viabilidade de PBMC pelo ensaio de MTT. Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando teste ANOVA, com teste de Tukey como pós-teste.

4.3 Efeito do pré-tratamento com talidomida e análogos CAT-15 e CAT-16 na produção de TNF- α por PBMC e por células HT-29 estimuladas com LPS

A produção de TNF- α por PBMC e por células HT-29, estimuladas com LPS foi avaliada, investigando-se o efeito do tratamento prévio com talidomida e com os compostos CAT-15 e CAT-16.

O PBMC foi plaqueado na concentração de $2,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹, sendo as células tratadas com talidomida, CAT-16 e CAT-15 nas concentrações de 100, 200, 400 e 800 μ M e dexametasona a 1 μ M. Após 1 hora de cultivo as células foram estimuladas com 2 μ g.mL⁻¹ de LPS por 24 e 48 horas, e, em seguida, os sobrenadantes foram coletados e utilizados para determinação da produção de TNF- α pelo método ELISA. As porcentagens de inibição foram calculadas pela fórmula: **100 x (1 - (A/B))**, onde A representa a concentração de citocina/quimiocina em questão na amostra e B representa a concentração do grupo controle.

A figura 14 mostra que, após 24 horas de incubação, o LPS estimulou a produção de TNF- α pelo PBMC ($413,7 \pm 20,3$ pg.mL⁻¹). O tratamento com talidomida (Figura 14 A) causou redução da produção dessa citocina em relação ao grupo não tratado com LPS em 20,8% na concentração de 100 μ M ($p < 0,01$; $319,4 \pm 34,2$ pg.mL⁻¹), 34,7% a 400 μ M ($p < 0,001$; $270,0 \pm 8,3$ pg.mL⁻¹), 50,9% a 800 μ M ($p < 0,001$; $203,3 \pm 6,9$ pg.mL⁻¹). A produção de TNF- α não foi influenciada pela concentração de 200 μ M da talidomida.

O tratamento com o composto CAT-16 (Figura 14B) provocou redução da produção de TNF- α em 38,2% somente na concentração de 800 μ M ($p < 0,01$; $255,6 \pm 27,4$ pg.mL⁻¹). O análogo CAT-15 não apresentou atividade imunomodulatória sobre a produção de TNF- α por PBMC em nenhuma das concentrações testadas (Figura 14C). Na presença de dexametasona a 1 μ M, a produção foi reduzida em 74,3% ($p < 0,001$; $106,3 \pm 6,9$ pg.mL⁻¹) (Figura 14D).

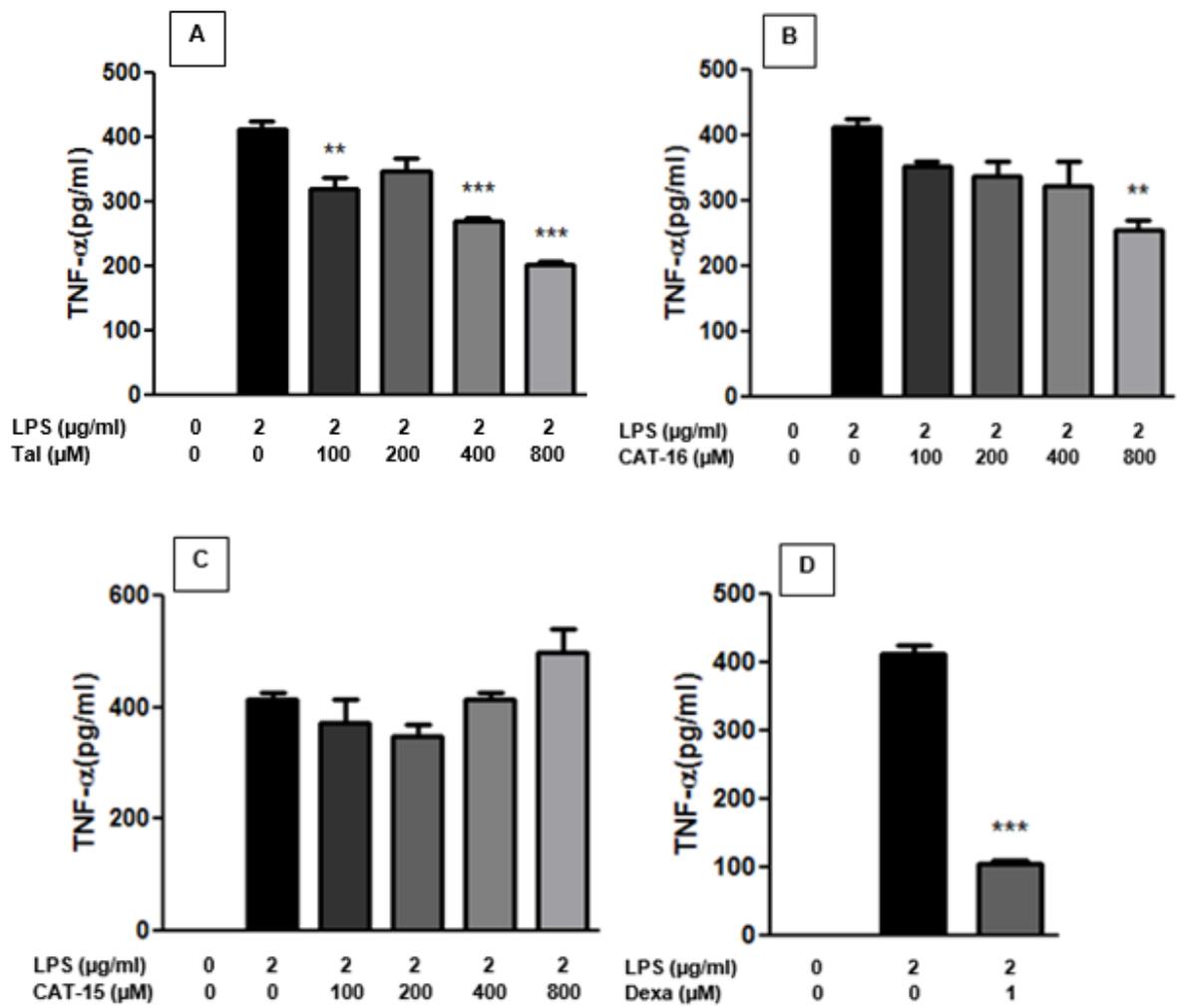


Figura 14 Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de TNF- α pelo PBMC estimulado por LPS por 24 horas. Efeito da talidomida (A), análogos CAT-16 (B) e CAT-15 (C) nas concentrações de 100, 200, 400 e 800 μ M. Efeito da dexametasona na concentração de 1 μ M (D). Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando teste ANOVA, com teste de Tukey como pós-teste e são representativos de 4 experimentos independentes. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ versus grupo estimulado por LPS, não tratado.

Após 48 horas de tratamento com LPS a produção de TNF- α por PBMC foi de $376,53 \pm 23,2$ pg.mL⁻¹ (Figura 15). O tratamento com talidomida (Figura 15A) causou redução da produção dessa citocina em relação ao grupo não tratado com LPS, em todas as concentrações testadas, sendo em 25% ($p < 0,01$; $280,0 \pm 21,9$ pg.mL⁻¹), 23,7% ($p < 0,01$; $287,0 \pm 27,7$ pg.mL⁻¹), 47,6% ($p < 0,001$; $197,4 \pm 3,1$ pg.mL⁻¹) e 55,5% ($p < 0,001$; $167,4 \pm 13,1$ pg.mL⁻¹) a 100, 200, 400 e 800 μ M, respectivamente. Neste modelo, a redução da produção de TNF- α provocada pelo análogo CAT-16 (Figura 15B) foi de 20% na concentração de 100 μ M ($p < 0,1$; $300,1 \pm 36,4$ pg.mL⁻¹), 29,5% na concentração de 200 μ M ($p < 0,01$; $265,5 \pm 28,7$ pg.mL⁻¹), 31,2% a 400 μ M ($p < 0,01$; $259,2 \pm 19,3$ pg.mL⁻¹) e 25,9% a 800 μ M ($279,1 \pm 14,5$ pg.mL⁻¹). A produção de TNF- α por PBMC não foi influenciada pelo análogo CAT-15, com exceção da concentração de 800 μ M, que induziu uma elevação de 24% ($p < 0,01$; $498,4 \pm 29,6$ pg.mL⁻¹) (Figura 15C). Após 48 horas de incubação com LPS, a dexametasona manteve atividade bastante semelhante à observada com 24 horas, causando uma redução de 74,9% ($p < 0,001$; $94,4 \pm 5,0$ pg.mL⁻¹) na produção de TNF- α (Figura 15D).

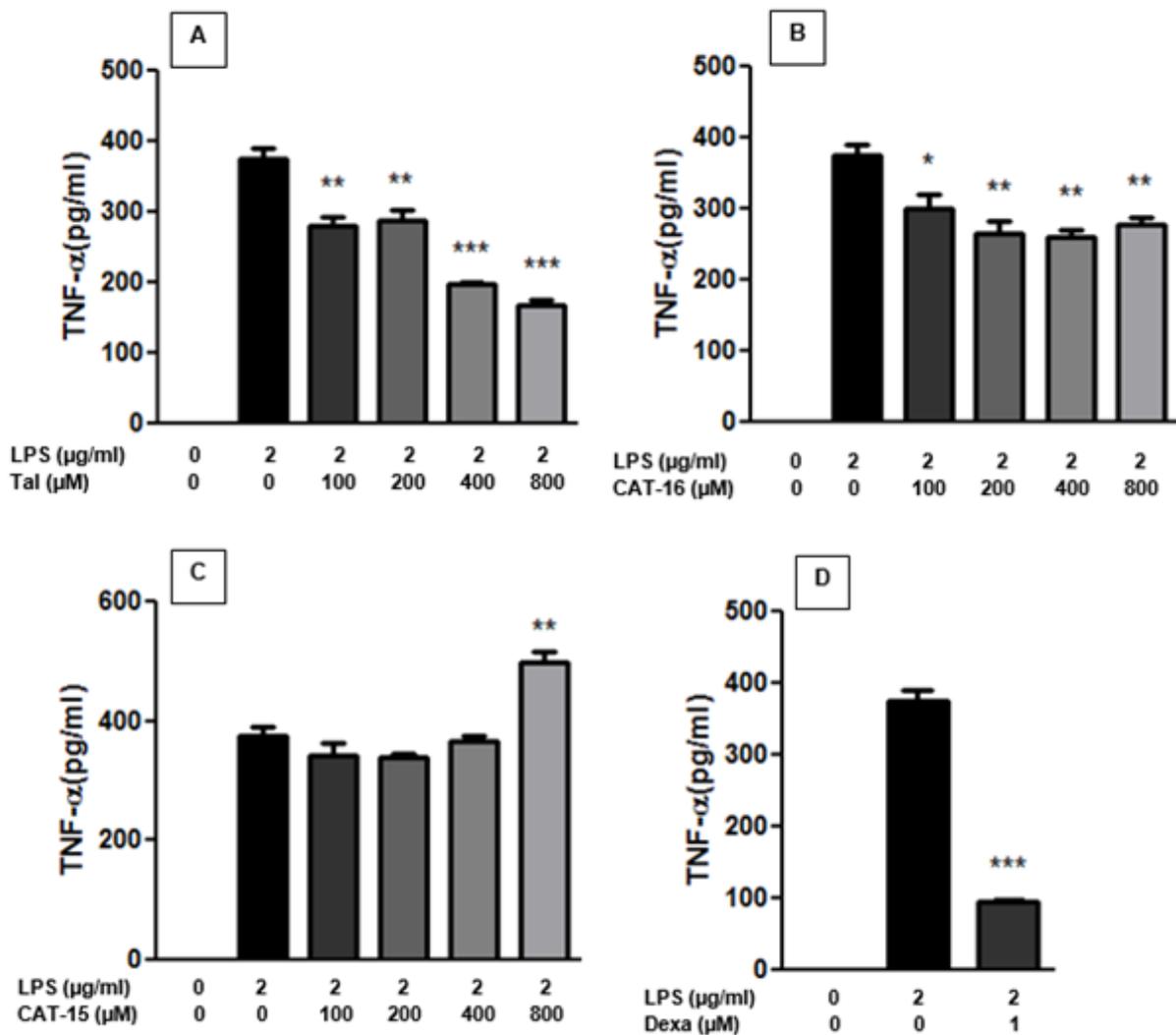


Figura 15 Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de TNF- α pelo PBMC estimulado por LPS por 48 horas. Efeito da talidomida (A), análogos CAT-16 (B) e CAT-15 (C) nas concentrações de 100, 200, 400 e 800 μ M. Efeito da dexametasona na concentração de 1 μ M (D). Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando teste ANOVA, com teste de Tukey como pós-teste e são representativos de 4 experimentos independentes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ versus grupo estimulado por LPS, não tratado.

Para as células HT-29, o plaqueamento se deu em placas de 24 poços na concentração de 5×10^4 células.mL⁻¹. Após 7 dias de cultivo, as células em subconfluência foram pré-tratadas por 1 hora com talidomida, CAT-15 e CAT-16 nas concentrações de 100, 400, 800 e 1600 μ M, e dexametasona a 1 μ M. Em seguida, as culturas foram estimuladas com 250ng.mL⁻¹ de LPS e, após 18 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados e utilizados para determinar a produção de TNF- α pelo método ELISA. Nenhuma produção de TNF- α em resposta ao LPS foi verificada nas culturas de células HT-29 (dados não mostrados).

4.4 Efeito do pré-tratamento com talidomida e análogos CAT-15 e CAT-16 na produção de IL-6 por PBMC e células HT-29

Para a avaliação da produção de IL-6 em resposta ao tratamento com talidomida, CAT-15, CAT-16 e dexametasona, foram utilizadas as mesmas condições padrões do ensaio anterior, tanto para o PBMC quanto para as células HT-29.

O PBMC não estimulado produziu $2,1 \pm 0,5$ pg.mL⁻¹ de IL-6 e após 24 horas de incubação com LPS essa produção se elevou para $198,1 \pm 4,1$ pg.mL⁻¹ (Figura 16). No tratamento por 24 horas, em todas as concentrações testadas, a talidomida (Figura 16A) causou redução da produção de IL-6 ($p < 0,001$) em relação ao grupo somente estimulado com LPS, sendo de 47% para 100 μ M ($105,5 \pm 2,2$ pg.mL⁻¹), 50% para 200 μ M ($99,0 \pm 3,0$ pg.mL⁻¹), 53% para 400 μ M ($93,2 \pm 2,2$ pg.mL⁻¹) e 55% para 800 μ M ($88,5 \pm 3,3$ pg.mL⁻¹).

O análogo CAT-16 (Figura 16B) apresentou atividade inibitória sobre a produção de IL-6 por PBMC em todas as concentrações testadas, nos ensaios de 24 horas de estimulação com LPS, sendo 18% para 100 μ M ($p < 0,01$; $161,5 \pm 4,5$ pg.mL⁻¹), 18% para 200 μ M ($p < 0,01$; $163,2 \pm 3,2$ pg.mL⁻¹), 23% para 400 μ M ($p < 0,001$; $151,6 \pm 5,7$ pg.mL⁻¹) e 24% para 800 μ M ($p < 0,001$; $149,8 \pm 0,4$ pg.mL⁻¹). Da mesma forma, o análogo CAT-15 (Figura 16C) também apresentou importante atividade inibitória sobre a produção de IL-6, sendo 9% para 100 μ M ($p < 0,05$; $179,0 \pm 5,7$ pg.mL⁻¹), 14% para 200 μ M ($p < 0,01$; $170 \pm 2,3$ pg.mL⁻¹), 11% para 400 μ M ($p < 0,01$; $175,0 \pm 0,8$ pg.mL⁻¹) e 7% para 800 μ M ($p < 0,05$; $184,4 \pm 0,2$ pg.mL⁻¹). Como esperado, a dexametasona (Figura 16D) a 1 μ M reduziu a produção de IL-6 em 68% ($p < 0,001$; $63,2 \pm 0,7$ pg.mL⁻¹).

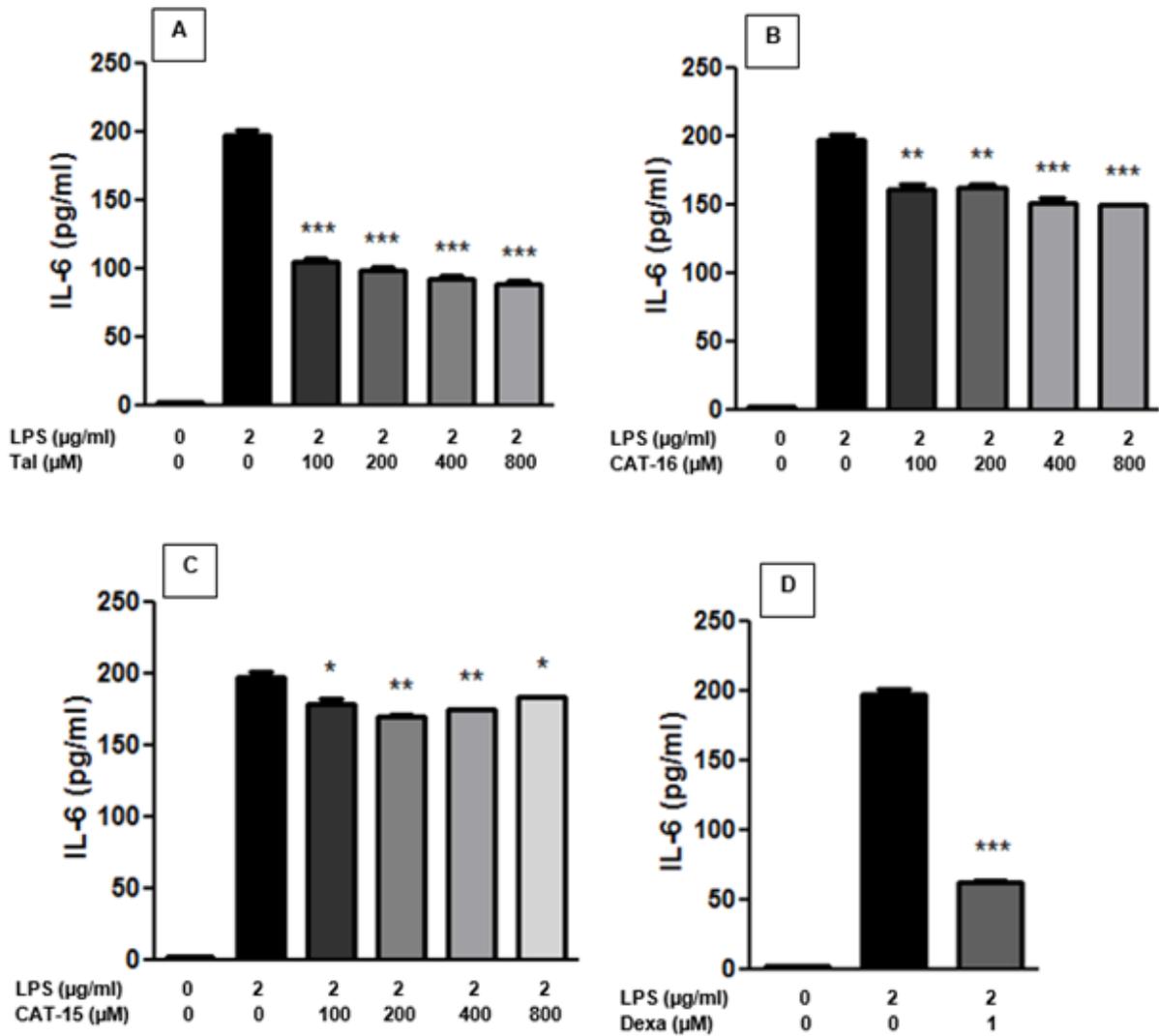


Figura 16 Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de IL-6 por PBMC estimulado por LPS por 24 horas. Efeito da talidomida (A), análogos CAT-16 (B) e CAT-15 (C) nas concentrações de 100, 200, 400 e 800µM. Efeito da dexametasona na concentração de 1µM (D). Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando teste ANOVA, com teste de Tukey como pós-teste. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ versus grupo apenas estimulado com LPS.

Quando o PBMC foi estimulado e incubado por 48 horas (Figura 17) na presença do LPS, a produção de IL-6 foi 9 vezes maior que a observada no grupo não estimulado ($p < 0,001$; $172,2 \pm 3,7 \text{ pg.mL}^{-1}$). Nestas condições de cultura, o tratamento com talidomida (Figura 17A) foi capaz de inibir a produção de IL-6 ($p < 0,001$) em 100, 200, 400 e $800\mu\text{M}$, sendo 37% ($108,0 \pm 3,2 \text{ pg.mL}^{-1}$), 40% ($104,0 \pm 0,02 \text{ pg.mL}^{-1}$), 43% ($97,0 \pm 5,6 \text{ pg.mL}^{-1}$) e 59% ($71,4 \pm 1,9 \text{ pg.mL}^{-1}$), respectivamente.

Como esperado, o composto CAT-16 (Figura 17B) também inibiu a produção de IL-6 por PBMC em todas as concentrações, sendo 13% para $100\mu\text{M}$ ($p < 0,05$; $149,0 \pm 2,6 \text{ pg.mL}^{-1}$), 16% para $200\mu\text{M}$ ($p < 0,05$; $145,4 \pm 0,4 \text{ pg.mL}^{-1}$), 21% para $400\mu\text{M}$ ($p < 0,01$; $135,5 \pm 12,0 \text{ pg.mL}^{-1}$) e 23% para $800\mu\text{M}$ ($p < 0,01$; $132,4 \pm 0,7 \text{ pg.mL}^{-1}$). Surpreendentemente, o composto CAT-15 (Figura 17C) apresentou atividade inibitória em 48 horas de incubação, provocando redução da produção de IL-6 em 200 e $800\mu\text{M}$, sendo 16% ($p < 0,05$; $144,8 \pm 0,42 \text{ pg.mL}^{-1}$) e 46% ($p < 0,001$; $92,3 \pm 0,5 \text{ pg.mL}^{-1}$), respectivamente. Dexametasona (Figura 17D) mostrou 61% de inibição ($p < 0,001$; $67,0 \pm 1,0 \text{ pg.mL}^{-1}$).

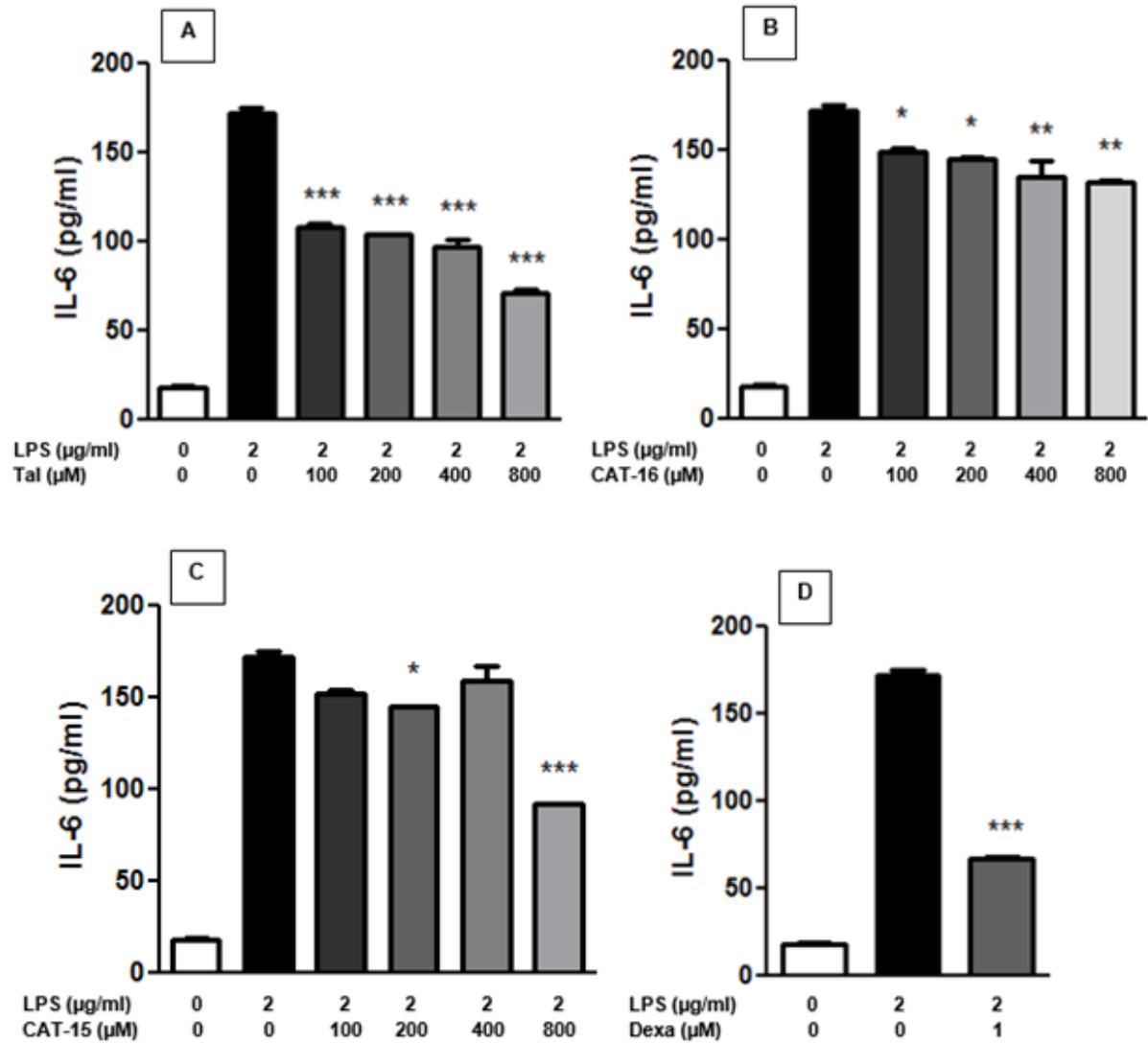


Figura 17 Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de IL-6 pelo PBMC estimulado por LPS por 48 horas. Efeito da talidomida (A), análogos CAT-16 (B) e CAT-15 (C) nas concentrações de 100, 200, 400 e 800µM. Efeito da dexametasona na concentração de 1µM (D). Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando teste ANOVA, com teste de Tukey como pós-teste e são representativos de 4 experimentos independentes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ versus grupo apenas estimulado por LPS.

Não foi detectada produção de IL-6 nos sobrenadantes de cultura de células HT-29, após 18 horas de incubação com LPS (dados não mostrados).

4.5 Efeito do pré-tratamento com talidomida e análogos CAT-15 e CAT-16 na produção de IL-10 por PBMC e células HT-29

A IL-10 é uma citocina com potentes propriedades anti-inflamatórias, desempenhando papel central na limitação de respostas imunes, mantendo, desta forma, a homeostase. Sabe-se que sua deficiência leva a respostas imunes exacerbadas, com aumento da incidência de doenças inflamatórias crônicas como as DIIs e outras desordens autoimunes (LYER e CHENG, 2012). Neste sentido, buscou-se avaliar o efeito do tratamento com talidomida e dos análogos CAT-15 e CAT-16 sobre a produção de IL-10 por PBMC e por células HT-29, respeitando as condições padronizadas previamente.

A figura 18 mostra que células PBMC estimuladas com LPS por 24 horas mostraram elevada produção de IL-10 ($178,6 \pm 26,2 \text{ pg.mL}^{-1}$), em relação ao grupo controle. Além disso, nenhum dos compostos estudados modulou significativamente a produção de IL-10 neste modelo.

O composto CAT-15 (Figura 19C) inibiu significativamente a produção de IL-10, induzida pelo LPS ($233,7 \pm 46,1 \text{ pg.mL}^{-1}$), nas concentrações de $200\mu\text{M}$ (28%, $p < 0,05$; $168,1 \pm 14,5 \text{ pg.mL}^{-1}$), $400\mu\text{M}$ (61%; $p < 0,001$; $91,6 \pm 6,1 \text{ pg.mL}^{-1}$) e $800\mu\text{M}$ (66%; $p < 0,001$; $79,7 \pm 9,9 \text{ pg.mL}^{-1}$) ter sido similar após 24 horas ou 48 horas de cultivo. Na presença da dexametasona por 48 horas (Figura 19D), a produção de IL-10 foi reduzida em 53% ($p < 0,01$; $110 \pm 3,1 \text{ pg.mL}^{-1}$).

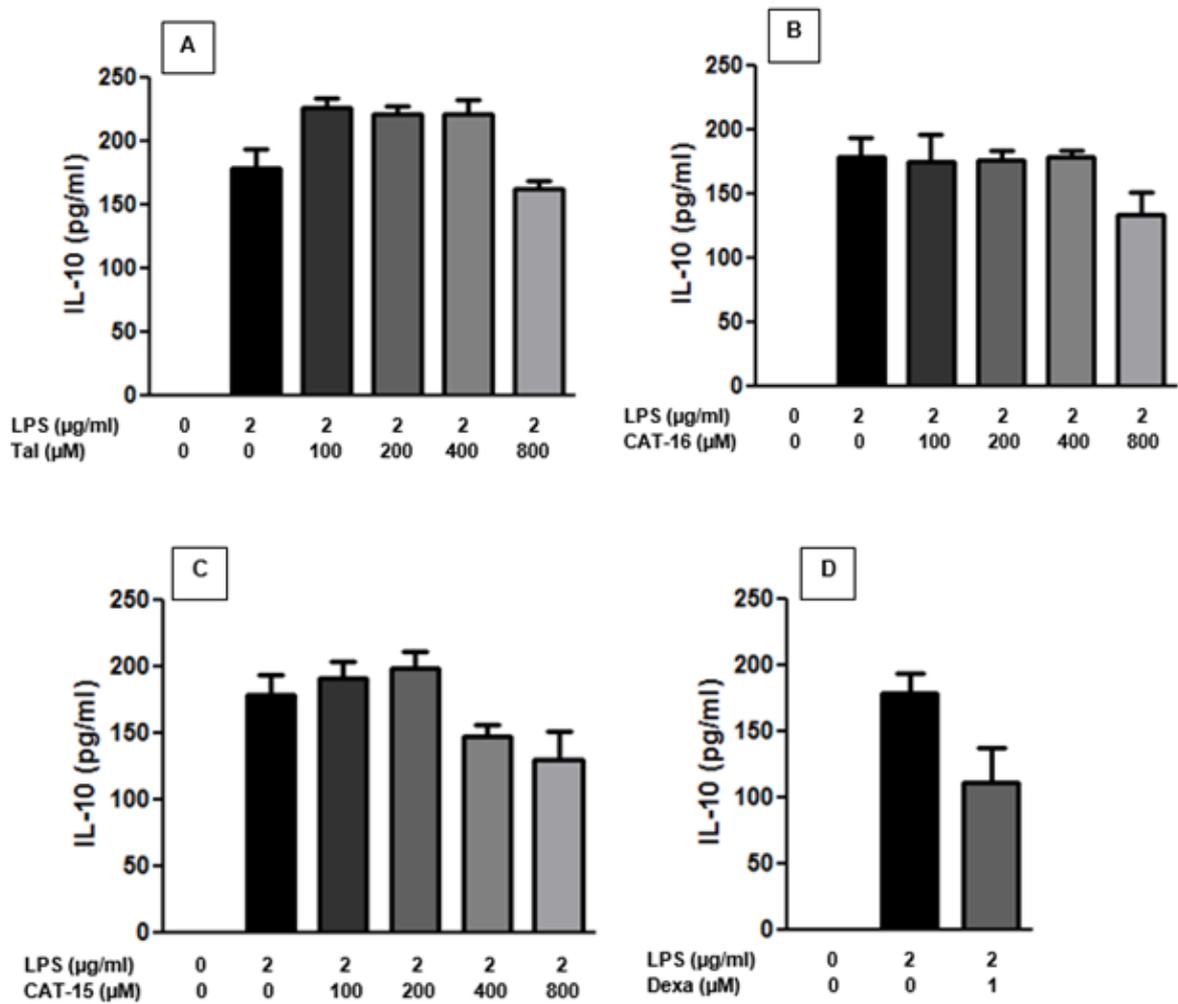


Figura 18 Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de IL-10 pelo PBMC estimulado por LPS por 24 horas. Efeito da talidomida (Tal) (A), análogos CAT-16 (B) e CAT-15 (C) nas concentrações de 100, 200, 400 e 800µM. Efeito da dexametasona na concentração de 1µM (D). Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando teste ANOVA, com teste de Tukey como pós-teste e são representativos de 4 experimentos independentes.

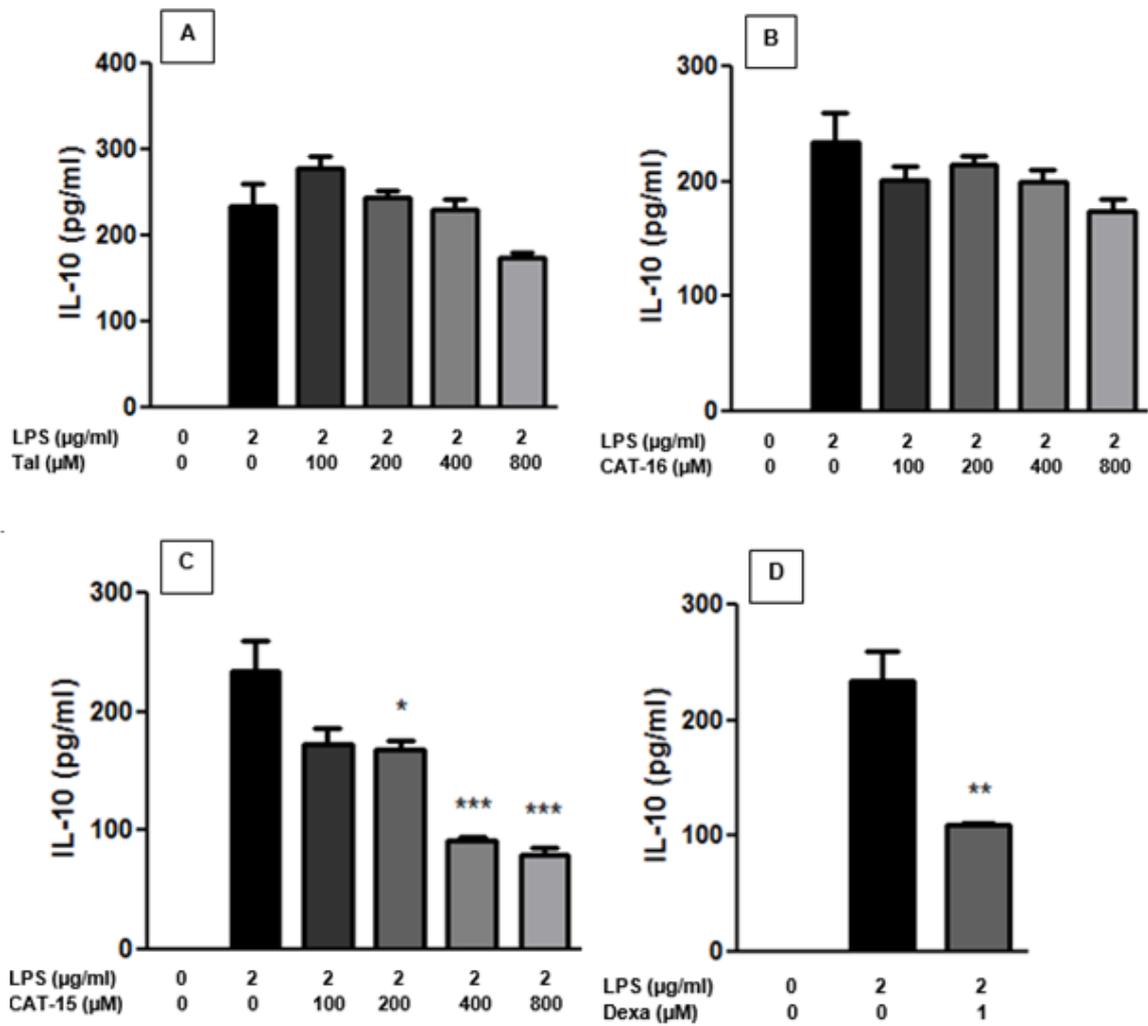


Figura 19 Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de IL-10 pelo PBMC estimulado por LPS por 48 horas. Efeito da talidomida (Tal) (A), análogos CAT-16 (B) e CAT-15 (C) nas concentrações de 100, 200, 400 e 800µM. Efeito da dexametasona na concentração de 1µM (D). Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando teste ANOVA, com teste de Tukey como pós-teste e são representativos de 4 experimentos independentes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ versus grupo apenas estimulado por LPS.

Não foi detectada produção de IL-10 em resposta ao LPS nos sobrenadantes de cultura de células HT-29, após 18 horas de incubação (dados não mostrados).

4.6 Efeito do tratamento com talidomida e análogos CAT-15 e CAT-16 na produção de CXCL-10 por células HT-29 e PBMC

O impacto da talidomida e dos análogos CAT-15 e CAT-16 na produção de CXCL-10 foi investigado. Para o PBMC foram utilizadas as mesmas condições de cultura e estímulo com LPS já descritas neste estudo. Em contrapartida, para as células HT-29 foram feitos dois modelos de tratamento: simultâneo, onde as células receberam o tratamento com talidomida, CAT-15, CAT-16 e dexametasona, simultaneamente ao estímulo com LPS, e pré-tratamento, onde as células receberam tratamento com os compostos acima citados, por 1 hora antes do estímulo com LPS. Foram utilizadas as mesmas condições de cultura, concentrações de talidomida, CAT-15, CAT-16 e dexametasona, bem como a concentração de LPS, já descritos anteriormente

A figura 20 mostra que as células HT-29 não estimuladas produziram $22,3 \pm 5,3$ pg.mL⁻¹ de CXCL-10, porém, quando estimuladas por 18 horas com LPS essa produção aumentou para $368,3 \pm 34,0$ pg.mL⁻¹. O tratamento simultâneo com talidomida (Figura 20A) causou redução da produção de CXCL-10 ($p < 0.001$) em relação ao grupo estimulado não tratado (LPS) nas concentrações de 400, 800 e 1600µM, sendo em 32% ($252,8 \pm 6,9$ pg.mL⁻¹), 34% ($243,1 \pm 8,8$ pg.mL⁻¹) e 67% ($123,3 \pm 1,3$ pg.mL⁻¹), respectivamente. A produção de CXCL-10 não foi influenciada pela menor concentração (100µM) da talidomida. O composto CAT-16 (Figura 20B) provocou redução da produção de CXCL-10 em 20% na concentração de 100µM ($p < 0,05$; $295,4 \pm 20,2$ pg.mL⁻¹), 32% a 400µM ($p < 0,001$; $250,4 \pm 18,6$ pg.mL⁻¹), 29% a 800µM ($p < 0,01$; $261,6 \pm 3,6$ pg.mL⁻¹) e 45% a 1600µM ($p < 0,001$; $201,6 \pm 30,0$ pg.mL⁻¹), em relação ao grupo somente estimulado com LPS, mostrando atividade sobre essa quimiocina em todas as concentrações usadas no modelo de tratamento simultâneo ao estímulo com LPS.

A figura 20D indica que, em resposta ao estímulo com LPS por 18 horas e na ausência da dexametasona, as células HT-29 produziram $150,7 \pm 8,0$ pg.mL⁻¹ de CXCL-10. Essa produção foi reduzida em 32% pelo tratamento simultâneo com dexametasona na concentração de 1 μ M ($p < 0,001$; $102,6 \pm 8,6$ pg.mL⁻¹). Ao contrário do esperado, o análogo CAT-15 não apresentou atividade imunomodulatória sobre a produção de CXCL-10 por células HT-29 estimuladas com LPS, em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 20C).

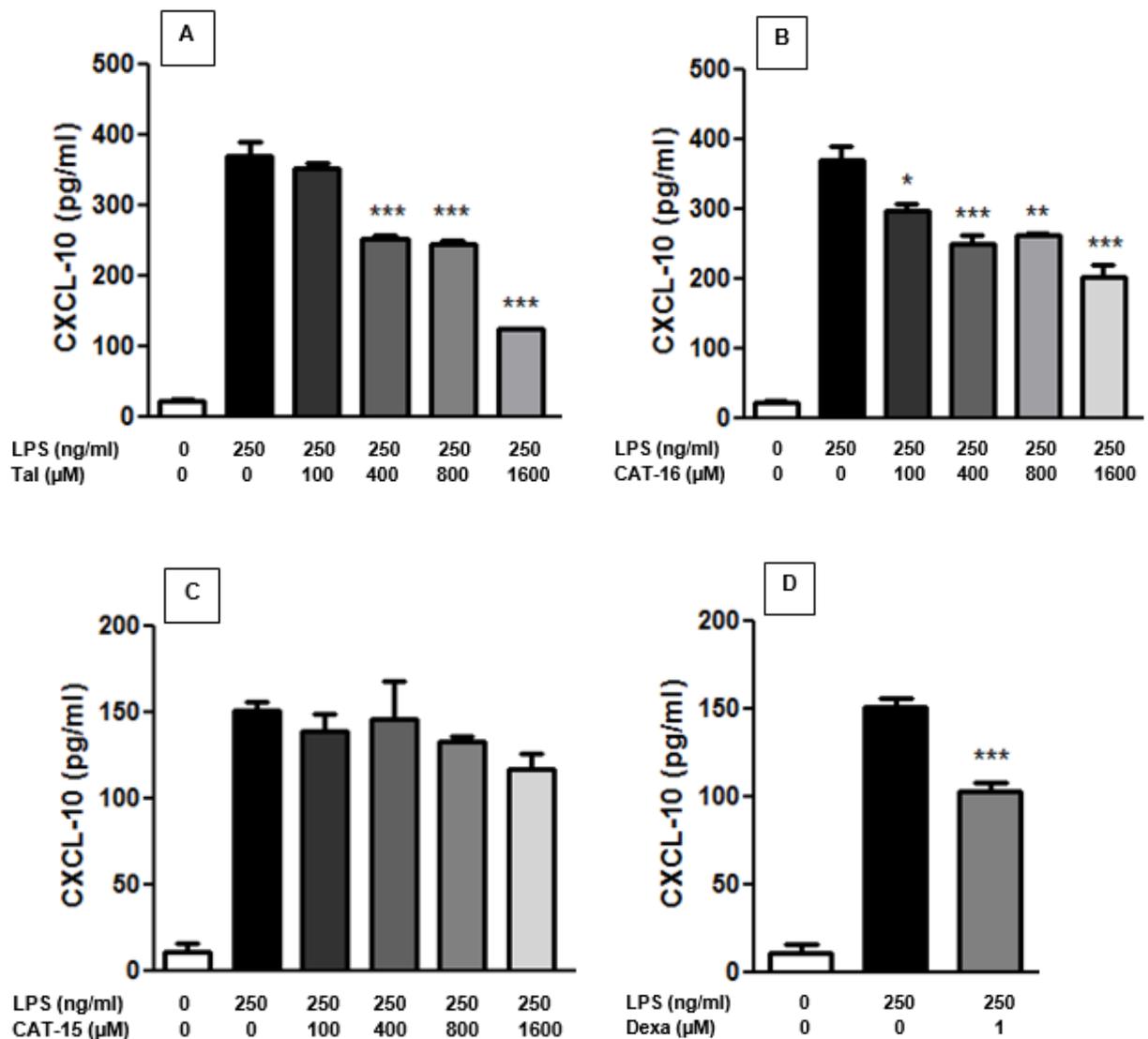


Figura 20 Efeito da talidomida e dos análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de CXCL-10 pelas células HT-29 estimuladas por LPS por 18 horas. Efeito da talidomida (A), análogos GI-16 (B) e SC-15 (C) nas concentrações de 100, 400, 800 e 1600 μ M. A dexametasona foi usada na concentração de 1 μ M (D). Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando o teste ANOVA, com teste de Tukey como pós-teste e são representativos de 3 experimentos independentes. *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$, versus grupo apenas estimulado por LPS.

Para as células que receberam pré-tratamento com talidomida, CAT-15, CAT-16 e dexametasona, o estímulo com LPS aumentou 2,62 ($292,0 \pm 10,2 \text{ pg.mL}^{-1}$) vezes a produção de CXCL-10, em comparação com o grupo controle não estimulado ($111,4 \pm 3,2 \text{ pg.mL}^{-1}$). O pré-tratamento com talidomida (Figura 21A) causou redução da produção de CXCL-10 em 28% ($p < 0,001$; $211,1 \pm 6,7 \text{ pg.mL}^{-1}$) e 30% ($p < 0,001$; $204,8 \pm 6,8 \text{ pg.mL}^{-1}$), nas concentrações de 800 e 1600 μM , respectivamente. O composto CAT-16 e a dexametasona (Figuras 21B e D) tiveram atividade inibitória semelhante a observada no tratamento simultâneo (LPS e CAT-16). o composto CAT-16 apresentou redução de 19% ($p < 0,001$; $238,2 \pm 11,2 \text{ pg.mL}^{-1}$), 34% ($p < 0,001$; $194,2 \pm 11,3 \text{ pg.mL}^{-1}$) e 43% ($p < 0,001$; $167,1 \pm 6,0 \text{ pg.mL}^{-1}$) nas concentrações 400, 800, 1600 μM , respectivamente. A dexametasona apresentou redução de 33% ($p < 0,001$; $197,8 \pm 15,0 \text{ pg.mL}^{-1}$) a 1 μM , em relação ao controle apenas estimulado com LPS.

Ao contrário do que foi observado no tratamento simultâneo, quando utilizado como pré-tratamento, o composto CAT-15 causou redução da produção de CXCL-10 nas concentrações de 800 μM ($p < 0,05$; $249,7 \pm 23,9 \text{ pg.mL}^{-1}$) e 1600 μM ($p < 0,001$; $205,7 \pm 11,2 \text{ pg.mL}^{-1}$) apresentando assim, nessas condições, atividade imunomodulatória sobre a produção de CXCL-10 (Figura 21C e tabela 1).

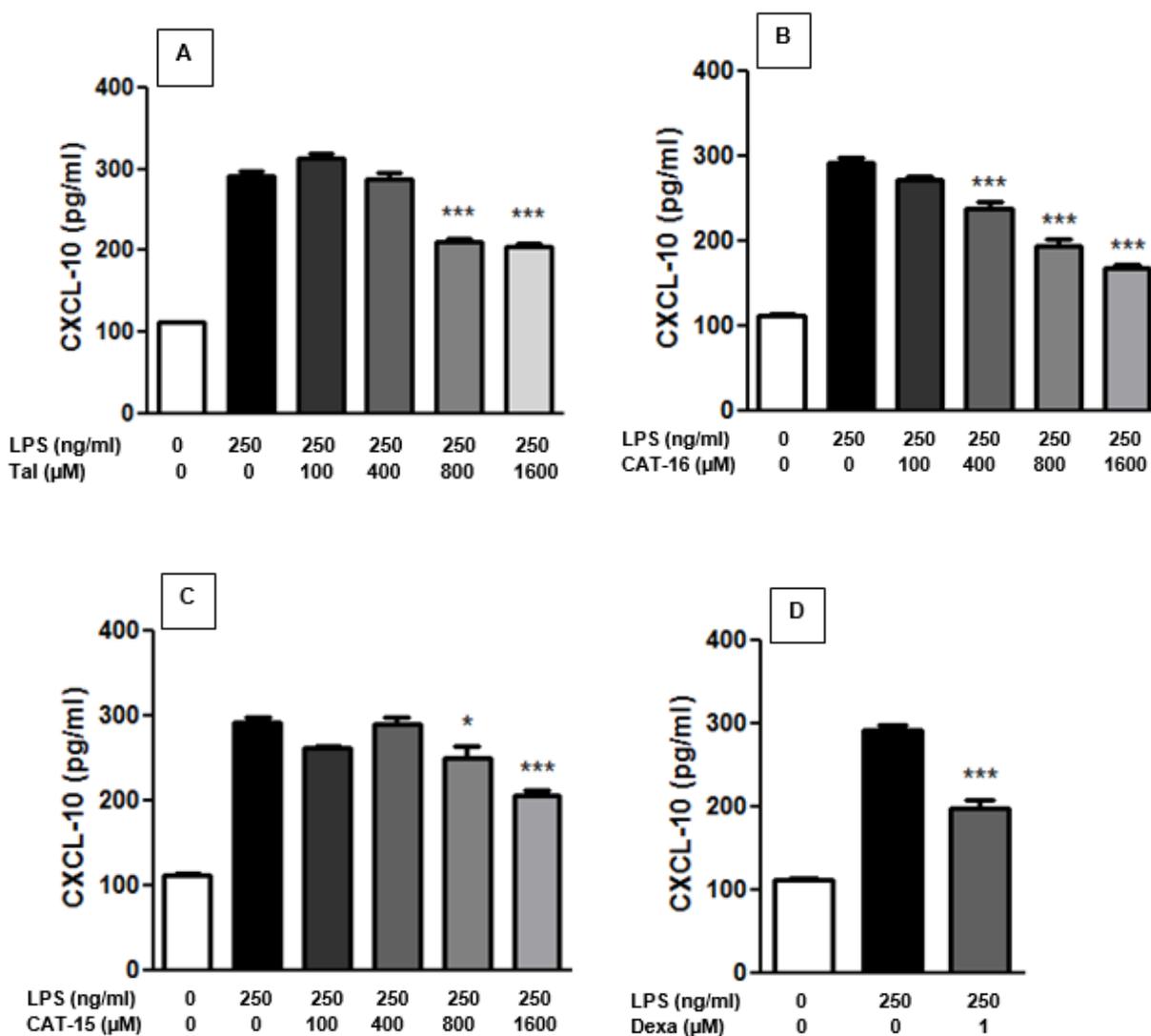


Figura 21 Efeito do pré-tratamento com talidomida e análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de CXCL-10 pelas células HT-29 estimuladas por LPS. Efeito da talidomida (Tal) (A), análogos CAT-16 (B) e CAT-15 (C) nas concentrações de 100, 400, 800 e 1600µM. Efeito da dexametasona na concentração de 1µM (D). Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando teste ANOVA, com teste de Tukey como pós-teste e são representativos de 3 experimentos independentes. *** = $p < 0,001$ versus grupo estimulado por LPS, não tratado, * = $p < 0,05$ versus grupo estimulado por LPS, não tratado.

Nos sobrenadantes da cultura de PBMC, não foi possível detectar a produção da quimiocina CXCL-10, em resposta ao estímulo com LPS, em nenhum dos tempos estudados (24 e 48 horas) (dados não mostrados).

Tabela 2 Produção de CXCL-10 (pg/ml) frente ao tratamento simultâneo e pré-tratamento de células HT-19 com talidomida, CAT-16 e CAT-15 nas concentrações de 100, 400, 800 e 1600 μ M. Dexametasona foi usada a 1 μ M. As culturas foram estimuladas com 250ng.mL⁻¹ de LPS por 18 horas, dado simultaneamente ou 1 hora após o tratamento com os compostos. Dados são expressos como médias \pm SEM, utilizando teste ANOVA e são representativos de 3 experimentos independentes. * = p < 0,05 em relação ao LPS, ** = p < 0,01 em relação ao LPS, *** = p < 0,001 em relação ao LPS.

TRATAMENTO		TRATAMENTO SIMULTÂNEO (pg/ml)	PRÉ-TRATAMENTO (pg/ml)
CONTROLE		18,7 \pm 22,3	111,4 \pm 3,2
	LPS	368,3 \pm 34,0	292,0 \pm 10,2
TALIDOMIDA	100 μ M	295,4 \pm 20,2	312,3 \pm 12,5
	400 μ M	252,8 \pm 6,9***	287,2 \pm 14,5
	800 μ M	243,1 \pm 8,8***	211,1 \pm 6,7***
	1600 μ M	123,3 \pm 1,3***	204,8 \pm 6,8***
CAT-16	100 μ M	295,4 \pm 20,2*	271,2 \pm 7,8
	400 μ M	250,4 \pm 18,6***	238,2 \pm 11,2***
	800 μ M	261,6 \pm 3,6**	194,2 \pm 11,3***
	1600 μ M	201,6 \pm 30,0***	167,1 \pm 6,0***
CAT-15	100 μ M	138,2 \pm 17,3	260,7 \pm 4,5
	400 μ M	145,5 \pm 38,3	288,4 \pm 13,9
	800 μ M	132,5 \pm 4,8	249,7 \pm 23,9*
	1600 μ M	117,0 \pm 14,8	205,7 \pm 11,2***
DEXA	1 μ M	102,6 \pm 8,6***	197,8 \pm 15,0***

4.7 Efeito do pré-tratamento com talidomida e análogos CAT-15 e CAT-16 na produção de IL-8 pelas células HT-29

Diversos estudos mostram que o LPS estimula as células epiteliais intestinais a secretarem IL-8 e peptídeos ativadores de neutrófilos (BÖCKER *et al*, 2003; RUSSO *et al*, 2014). Desta forma, buscou-se avaliar o efeito da talidomida e dos compostos CAT-15 e CAT-16 sobre a produção de IL-8 por células HT-29 estimuladas com LPS. Células HT-29 foram plaqueadas, pré-tratadas com as drogas e, após 1 hora de cultura, estimuladas com LPS nas mesmas condições já descritas nesse trabalho. A realização do ensaio imunoenzimático para quantificação de IL-8 foi feita no laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, São Paulo e, por isso, foi realizado apenas nas culturas de células HT-29.

A figura 22 mostra que apenas a talidomida e o composto CAT-16 na concentração de 100µM tiveram efeito imunomodulatório ($p < 0,01$) sobre a secreção de IL-8. Nenhuma das demais concentrações dos compostos utilizados apresentou atividade sobre a produção e secreção de IL-8.

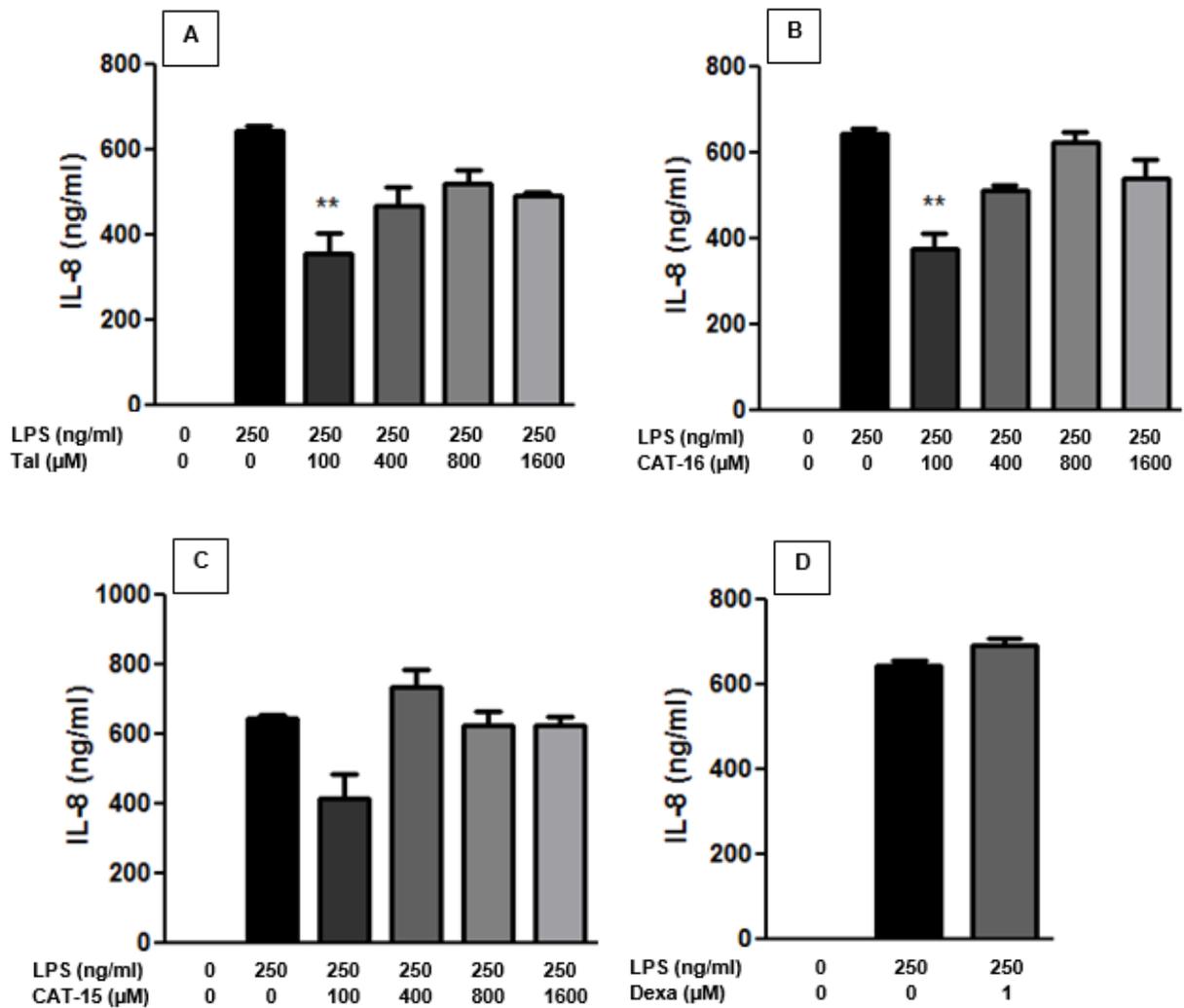


Figura 22 Efeito do pré-tratamento com talidomida e análogos CAT-16 e CAT-15 na produção de IL-8 pelas células HT-29 estimuladas por LPS por 18 horas. Efeito da talidomida (Tal) (A), análogos CAT-16 (B) e CAT-15 (C) nas concentrações de 100, 400, 800 e 1600 μM . Efeito da dexametasona na concentração de 1 μM (D). Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando teste ANOVA, com teste de Tukey como pós-teste. ** = $p < 0,01$ versus grupo estimulado por LPS, não tratado.

5 DISCUSSÃO

A talidomida apresenta atividade anti-inflamatória que a torna útil para o tratamento de diversas enfermidades como câncer e doenças inflamatórias e autoimunes (DIAMANTI *et al*, 2015; BEEDIE *et al*, 2012). Entretanto, sua teratogenicidade faz com que seu uso seja rigorosamente controlado e limitado (MARRIOT *et al*, 1998; BORGES e FRÖEHLICH, 2003).

Em busca de fármacos que apresentem menor teratogenicidade e baixa toxicidade, com atividade imunomodulatória semelhantes a talidomida, compostos análogos vêm sendo desenvolvidos pelo Laboratório de Química da UFJF e uma série destes foi relatada pela primeira vez por Almeida *et al* (2007) como tendo capacidade inibitória sobre o TNF- α . Esses compostos foram avaliados em diversos modelos *in vitro* e *in vivo*, em nosso laboratório, e ganharam destaque os análogos GI-16 e SC-15. Esses compostos sofreram mudança estrutural espontânea, passando a apresentar apenas uma estrutura ftalimida aberta. Essa modificação reduziu significativamente o peso molecular dos dois compostos, facilitou sua síntese, manteve a solubilidade em água e a ausência de centro quiral, o que pode reduzir potencialmente a ocorrência de efeitos colaterais (LIMA *et al*, 2001).

Portanto, frente à essas vantagens, esse trabalho buscou investigar a atividade imunomodulatória *in vitro*, dos dois novos análogos da talidomida, nomeados CAT-15 e CAT-16, utilizando cultura de células HT-29 e PBMC estimuladas com LPS.

Os principais achados desse estudo foram 1) os compostos CAT-15 e CAT-16, assim como a talidomida, não mostraram toxicidade para células HT-29 e PBMC; 2) o composto CAT-16 e a talidomida inibiram a produção de TNF- α , não influenciando a produção de IL-10. Por outro lado, o composto CAT-15 inibiu a produção de IL-10, mas não modificou a produção de TNF- α em PBMC estimulado com LPS; 3) todos os compostos estudados inibiram a produção de IL-6 por PBMC; 4) células HT-29 produziram CXCL-10 em resposta ao LPS, sendo esta produção inibida pela talidomida e pelos compostos CAT-15 e CAT-16; 5) talidomida e CAT-16 inibiram a produção de IL-8 por células HT-29.

Utilizando o teste de citotoxicidade pelo ensaio de MTT, foi demonstrado nesse trabalho que os compostos CAT-15 e CAT-16 são bem tolerados e não

apresentam toxicidade às células HT-29 e PBMC, não interferindo na viabilidade celular, com exceção do composto CAT-16 na maior concentração testada (1600 μ M) em células HT-29. Estes resultados estão de acordo com Costa *et al* (2015) que relata baixa citotoxicidade de análogos da talidomida em linhagens de células tumorais, dentre as quais HL-60, Sarcoma 180, HCT-8 e PBMC humanos. Lamie *et al* (2015) também testaram 16 novos derivados ftalimidas quanto a citotoxicidade em células tumorais (CEM, MCF7, HeLa), células normais (fibroblastos normais humanos (BJ) e células endoteliais da veia umbilical humanas (HUVEC)) e relataram que, em geral, os compostos não provocaram redução da viabilidade celular.

A partir do uso da talidomida para tratamento de eritema nodoso leproso (ENL), foi evidenciada sua atividade anti-inflamatória, e mais adiante, sua marcada atividade anti-TNF- α , modulando uma das principais citocinas envolvidas nos processos inflamatórios (SAMPAIO *et al*, 2006). Ao avaliar a atividade imunomodulatória da talidomida e dos análogos CAT-15 e CAT-16 sobre produção de TNF- α por PBMC estimulados com LPS por 24 e 48 horas, verificamos que a talidomida e o análogo CAT-16 causaram inibição da produção desta citocina e que a atividade foi melhorada para ambas os compostos após 48 horas de incubação, em todas as concentrações testadas. Em contraste, o análogo CAT-15 não influenciou a produção de TNF- α em nenhuma das concentrações testadas. Esses resultados estão de acordo com os achados de Mazzocchi *et al* (2012), que observou maior inibição da produção de TNF- α pelo composto GI-16.

Apesar de sua boa resposta ao LPS, pouco se sabe sobre a gama de citocinas e quimiocinas produzidas por células HT-29 frente a este estímulo (JUNG *et al*, 1994). Alguns estudos apontam a produção de TNF- α por células HT-29. Kim *et al* (2004) encontraram expressão de mRNA e proteína TNF- α após estímulo com LPS a 1 μ g/ml por 24 horas. Duary *et al* (2014) também encontraram a expressão dessa citocina quando as células HT-29 foram estimuladas com 100ng/ml de LPS por 3 horas. Porém, no nosso modelo de estudo não foi possível mostrar produção de TNF- α pelas células HT-29 frente ao estímulo por LPS.

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica envolvida na regulação imune, hematopoiese, inflamação e oncogênese (KIMURA e KISHIMOTO, 2010). Diferentes autores relatam atividade anti-IL-6 da talidomida e de diversos compostos análogos (CALLIGARIS-CAPPIO *et al*, 1991; MAZZOCOLI *et al*, 2012).

De fato, a talidomida e a lenalidomida são indicadas para o tratamento do mieloma múltiplo, apresentando capacidade de redução dos níveis de IL-6 (GUPTA *et al*, 2001; JEANNY *et al*, 2007). Em concordância, observamos que tanto a talidomida quanto os análogos CAT-16 e CAT-15 apresentaram elevada atividade inibitória sobre a produção de IL-6 pelo PBMC. Estes resultados estão de acordo com resultados anteriores de nosso Laboratório (MAZZOCCOLI *et al*, 2012) que mostraram elevada atividade inibitória de derivados da talidomida com anel ftalimida aberto sobre a produção de IL-6 por PBMC humano e por células J774.A murinas.

No presente estudo, o estímulo com LPS não induziu produção de IL-6 pelas células HT-29. Em relação a secreção de IL-6 pelas células epiteliais intestinais, os resultados na literatura são conflitantes (ROGLER e ANDUS, 1998). Zheng *et al* (2016), usando células HT-29 estimuladas com LPS, não encontraram expressão de mRNA para IL-6 após 8 horas de estímulo. Da mesma forma, Rogler *et al* (2000) constataram uma expressão discreta de IL-6 em biópsia de mucosa de pacientes com doença inflamatória intestinal, em comparação com mucosa de indivíduos saudáveis, onde não foi detectada a expressão desta citocina. Juntos, esses resultados sugerem uma baixa participação da IL-6 na inflamação intestinal.

A IL-10 é uma importante citocina envolvida no controle de respostas imunes e inflamatórias (GRÜTZ, 2005). No presente trabalho, ao avaliarmos a atividade da talidomida e dos análogos estudados sobre a produção de IL-10 por PBMC estimulados com LPS, verificamos que apenas o análogo CAT-15 foi capaz de inibir a produção de IL-10, após 48 horas de incubação, na maioria das concentrações testadas,

A talidomida e o composto CAT-16 não influenciaram a produção de IL-10 por PBMC estimulado com LPS. Carvalho *et al* (2012), mostraram a modulação de forma distinta entre a talidomida e seu análogo, LASSBio-542, formado pela condensação de um anidrido ftalimido com amina, sobre a produção de IL-10 por PBMC humano estimulado com LPS, tendo a talidomida elevado a produção de IL-10 e, em contraste, o análogo apresentou atividade inibitória sobre a IL-10. Rowland *et al* (1998) mostraram que em PBMC estimulado com PHA por 9 horas, o tratamento com talidomida não apresentou efeito significativo sobre a expressão de mRNA para IL-10, bem como nos níveis da citocina no sobrenadante da cultura após 48 horas de incubação. Outros estudos, no entanto, mostram análogos ftalimídicos,

em cultura de PBMC estimulados com LPS, induzindo aumento da produção de IL-10 (CORRAL *et al*, 1996; MAZZOCCOLI *et al*, 2012).

Nossos resultados mostram inibição da produção de IL-10 pelo composto CAT-15, sugerindo que esse composto pode ter importante aplicação no tratamento de patologias associadas ao descontrole da produção de IL-10. A IL-10 é produzida não apenas para contrabalançar a inflamação, mas também para atuar como um fator de crescimento de células tumorais. A produção de IL-10 é aumentada em quase a metade dos pacientes com mieloma múltiplo, sendo detectada também em indivíduos com leucemia plasmática e plasmocitoma solitário (KLEIN *et al*, 1998; LU *et al*, 1995; YUE *et al*, 1997). Além disso, a produção excessiva de IL-10 tem sido envolvida na imunoparalisia que ocorre no choque séptico (GRÜTZ, 2005). No presente trabalho, o estímulo de células HT-29 com LPS não induziu a produção de IL-10. Duary *et al* (2014) mostraram que o estímulo com LPS em células HT-29 não induz a produção de IL-10, quando comparado com estímulo utilizando cepas de pró-bióticos. O entendimento de como o LPS e pró-bióticos induzem respostas distintas nas células HT-29 é necessário e poderá favorecer a um melhor conhecimento sobre as relações hospedeiro-microbiota comensal (DUARY *et al*, 2014).

O CXCL-10 desempenha importante participação na proliferação e sobrevivência de células epiteliais (LIU *et al*, 2011). Diversos estudos mostram aumento da produção de CXCL-10 pelas células epiteliais intestinais na mucosa inflamada de pacientes com DIIs (MANOUSOU, 2008; MAYER *et al*, 2013). Porém, há escassez de relatos, até a presente data, sobre a produção de CXCL-10 induzida experimentalmente por LPS em cultura de células HT-29.

No presente trabalho, as células HT-29 foram estimuladas com LPS e IFN- γ e avaliadas quanto a produção de CXCL-10. Nossos resultados mostram, pela primeira vez, que as células HT-29 produzem grande quantidade de CXCL-10 em resposta ao LPS. Também foi possível observar que, conforme esperado, o IFN- γ melhorou a resposta a este estímulo. Angrisano *et al* (2010) também verificaram um aumento da resposta ao LPS pelas células HT-29 em associação ao IFN- γ (10ng/ml) pelo aumento da produção de IL-8, sendo esse efeito atribuído ao possível aumento da expressão do complexo TL4-MD2, importante mediador da resposta ao LPS.

De fato, a boa resposta das células HT-29 ao estímulo por LPS está de acordo com a literatura e pode estar relacionada com a expressão de TLR4 nessas

células. Furrie e colaboradores (2005) evidenciaram que a expressão de TLR4 na mucosa saudável é confinada às células da cripta. Neste caso, a expressão de TLR4 diminui à medida que essas células se movem em direção a superfície luminal, onde não foi encontrada expressão de TLR4. Nesse mesmo estudo, foi evidenciado aumento da expressão de TLR4 em células HT-29 em resposta ao LPS. Da mesma forma, Cario *et al* (2005) encontraram expressão basal de TLR4 em células HT-29.

Neste trabalho, mostramos que a talidomida e os análogos CAT-15 e CAT-16 apresentam atividade inibitória sobre a produção de CXCL-10 pelas células HT-29 estimuladas por LPS. Destaque para o análogo CAT-16, que foi capaz de modular a produção dessa quimiocina em concentrações menores que a talidomida. Esses resultados, associados a inibição da produção de TNF- α pela talidomida e pelo composto CAT-16 em PBMC estimulado com LPS, reforçam o potencial desse composto e da talidomida na inibição da ativação e migração de células envolvidas em respostas inflamatórias do tipo T_H1. Em relação ao PBMC, não foi detectada produção de CXCL-10 em resposta ao LPS. Este resultado difere do obtido por MAZZOCOLI *et al* (2012), que mostraram efeito inibitório da talidomida e de análogos sobre a produção de CXCL-10 em PBMC em resposta ao LPS. Essa diferença de resultados pode estar relacionada com diferenças na resposta ao LPS dependente do hospedeiro.

A IL-8 participa do processo inflamatório pela sua ação quimiotática e ativadora de neutrófilos, sendo as células HT-29 descritas como fortes produtores dessa quimiocina frente ao estímulo por LPS (MANOUSOU *et al*, 2008). Estudos mostram atividade variável da talidomida e de seus análogos sobre a produção de IL-8. El-Aarag *et al* (2014) avaliaram o efeito do tratamento com a talidomida e análogos da talidomida contendo grupamento ditiocarbamato na expressão de IL-8 em células HUVEC e MDA-MB-231. Os autores observaram atividade inibitória da talidomida e de um dos análogos, sendo essa imunomodulação relacionada à concentração da droga. Em contrapartida, Kim *et al* (2004) mostraram que a talidomida não exerce nenhum efeito modulador na expressão de IL-8 em células HT-29 estimuladas com LPS. Ao estudarmos o efeito da talidomida e dos análogos CAT-15 e CAT-16 sobre a produção de IL-8 por células HT-29 estimuladas com LPS, foi constatado que apenas a concentração mais baixa da talidomida e do análogo CAT-16 foi detectada inibição da produção de IL-8. Além disso, no presente trabalho, a talidomida e os análogos, com destaque para CAT-16, apresentaram

marcada atividade inibitória sobre IL-6 em PBMC estimulados com LPS. Esse resultado reforça a importância desses compostos no controle de desordens inflamatórias caracterizadas pelo acúmulo de neutrófilos.

Os glicocorticoides são conhecidos por induzirem I κ B α , um inibidor do NF- κ B através dos receptores para glicocorticoides (GRs) e são drogas chaves no tratamento de inflamações agudas e patologias crônicas (ROWLAND *et al*, 1998). No presente trabalho, utilizamos a dexametasona como controle positivo na inibição da produção de citocinas. Nossos resultados mostram marcada atividade imunomodulatória da dexametasona sobre a produção de CXCL-10; porém, não influenciou na produção de IL-8 pelas células HT-29. Estes resultados concordam parcialmente como o trabalho de Sunil *et al* (2010), que mostra expressão de receptores para glicocorticoides extremamente baixa nas células HT-29, o que poderia explicar o fato da produção de CXCL-10 e IL-8 não ter sido influenciada pela dexametasona no presente estudo. A produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 foi também inibida pela dexametasona em todos os ensaios utilizando PBMC. Esses achados estão de acordo com o trabalho de Rowland *et al* (1998), que mostra que a dexametasona, empregada no tratamento de alergias e quadros agudizados de patologias crônicas, causa redução da produção de TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ em PBMC, correlacionando com melhora dos sintomas clínicos.

O presente estudo mostrou que, dentre os novos análogos estudados, o composto CAT-16 apresentou atividade imunomodulatória semelhante à talidomida, e superior a apresentada pelo composto CAT-15. A avaliação dos mecanismos pelos quais os análogos estudados regulam a produção das citocinas e quimiocinas testadas, merece futuras investigações. Podemos sugerir que os mesmos mecanismos utilizados pela talidomida na modulação da produção de TNF- α , ou seja, a inibição da ativação de NF- κ B (KEIFER *et al*, 2001), a degradação do mRNA (MOREIRA *et al*, 1993), e a ligação a glicoproteína ácida α -1 (TURK *et al*, 1996), entre outros, podem estar envolvidos.

Além disso, diversos estudos apresentam análogos da talidomida contendo grupamento amino ou nitro exercendo atividades inibitórias de destaque sobre a produção de TNF- α por PBMC estimulados com LPS, atividades estas muito semelhantes e, por vezes, superiores a talidomida (ALMEIDA *et al*, 2007; MULLER *et al*, 1999; MAZZOCOLI *et al*, 2012). Os novos análogos CAT-15 e CAT-16 são

quimicamente semelhantes, exceto pela presença do grupamento NO₂ no composto CAT-16. Mazzoccoli *et al* (2012), investigando a atividade dos análogos GI-16 e SC-15, observaram melhor atividade do análogo que continha grupamento NO₂, o composto GI-16. Neste mesmo trabalho, foi sugerido que a adição de NO₂ resulta em metabólitos amínicos adicionais que contribuíam para a eficácia superior do composto GI-16. Desta forma, podemos sugerir que a maior eficácia do análogo CAT-16 também seja relacionada à presença do grupo NO₂.

Portanto, podemos inferir que os compostos analisados, CAT-15 e CAT-16, mostram potencial aplicabilidade na modulação de respostas imunes inflamatórias. Entretanto, essa modulação depende do análogo em questão, do estímulo usado, do tipo de célula envolvida e da dosagem desses compostos, o que poderia explicar a atividade distinta entre os compostos sobre as diversas citocinas e quimiocinas testadas.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi avaliada a atividade biológica de dois novos análogos da talidomida, os compostos CAT-15 e CAT-16. Esses compostos mostraram potencial aplicabilidade no controle de respostas inflamatórias, com destaque importante para o composto CAT-16, que foi capaz de modular a produção de moléculas-chave como o TNF- α , IL-6, IL-10, CXCL-10 e IL-8. Além disso, esses novos compostos possuem estruturas simplificadas frente a maioria dos análogos desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa, conferindo baixo peso molecular, melhorando sua biodisponibilidade e reduzindo tanto a complexidade quanto o custo de produção. São compostos hidrossolúveis e não possuem carbono quiral, reduzindo a possibilidade de racemização e surgimento de efeitos adversos relacionados a talidomida. Esses resultados devem ser considerados e novos estudos devem ser realizados visando a utilização desses compostos no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para certas condições inflamatórias, autoimunes e tumorais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*, 7^oed. Tradução de Tatiana Ferreira. Robaina. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2005. Título do original: *Cellular and molecular immunology*

ANGRISANO, T.; PERO, R.; PELUSO, S.; KELLER, S.; SACCHETTI, S.; BRUNI, C, B.; CHIARIOTTI, L.; LEMBO, F. LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC Microbiology*, v.10, p. 170, 2010.

ALMEIDA, M.V.; TEIXEIRA, F.M.; SOUZA, M.V.N.; AMARANTE, G.W.; ALVES, C.C.; CARDOSO, S.H.; MATTOS, A.M.; FERREIRA, A.P.; TEIXEIRA, H.C. Thalidomide analogs from diamines: synthesis and evaluation as inhibitors of TNF-alpha production. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 55, p. 223-226, 2007.

ASHLEY, N.T.; WEIL, Z.M.; NELSON, R.J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 43, p. 385–406, 2012.

BEEDIE, S. L.; PEER, C. J.; PISLE, S.; GARDNER, E. R.; MAHONY, C.; BARNETT, S.; AMBROZAK, A.; GÜTSCHOW, M.; CHAU, C. H.; VARGESSON, N.; FIGGI, W. Anti-Cancer Properties of a Novel Class of Tetrafluorinated Thalidomide Analogs. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 10, n. 1158, p. 1535-7163, 2012

BÖCKER, U.; YEZERSKY, O.; FEICK, P.; MANIGOLD, T.; PANJA, A.; KALINA, W.; HERWECK, F.; ROSSOL, S.; SINGER, M.V. Responsiveness of intestinal epithelial Cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like Receptor 2 or CD14 expression. *International Journal of Colorectal Disease*, v. 167, n. 3, p. 1609-1616, 2003.

BORGES, L.G.; FROEHLICH, P. Talidomida – Novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. *Revista da Associação Médica Brasileira*, Porto Alegre v. 49, p. 96-102, 2003.

BOYAPATI, R, K.; ROSSI, A, G.; SATSANGI, J.; HO, G-T. Gut mucosal DAMPs in IBD: from mechanisms to therapeutic implications. *Nature Review, Mucosal Immunology*, 2016

CALABRESE, L.; FLEISCHER, JR.A.B. Thalidomide: Current and Potential Clinical Applications. *American Journal of Medicine*, v. 108, n. 6, p. 487-495, 1999.

CARIO, E.; PODOLSKY, E, K. Differential Alteration in Intestinal Epithelial Cell Expression of Toll-Like Receptor 3 (TLR3) and TLR4 in Inflammatory Bowel Disease. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 12, p. 7010–7017, 2000

CARIO, E.; ROSENBERG, I, M.; BRANDWEIN, S, L.; BECK, P, L.; REINECKER, H.; PODOLSKY, D, K. Lipopolysaccharide Activates Distinct Signaling Pathways in Intestinal Epithelial Cell Lines Expressing Toll-Like Receptors 1. *Journal of Immunology*, v. 164, p. 966-972, 2000

CARVALHO, D.S.; LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J.L.; ALVES, T.R.; NERY, A.C.; SARNO, E.N.; SAMPAIO, E.N. LASSBio-542: Novel Thalidomide Analog Distinctly Modulates IL-10 and Inhibits Angiogenesis, *Current Bioactive Compounds*, v. 8, n. 2, p. 167-175, 2012.

CASERO, JR. R.A.; WOSTER, P.M. Terminally Alkylated Polyamine Analogues as Chemotherapeutic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 1, p. 1-6, 2001.

CAVAILLON, J.; FITTING, C.; HAEFFNER- CAVAILLON, N.; KIRSCH, S.J.; WARREN, H.S. Cytokine Response by Monocytes and Macrophages to Free and Lipoprotein-Bound Lipopolysaccharide. *INFECTION AND IMMUNITY*, v. 58, n. 7, p. 2375-2382, 1990.

CHASTRE, E.; EMAMI, S.; ROSSELIN, G.; GESPACH, G. Vasoactive intestinal peptide receptor activity and specificity during enterocyte-like differentiation and retrodifferentiation of the human colonic cancerous subclone HT29- 18. *Elsevier Science Publishers*, v. 188, n. 2, p. 197-204, 1985

CHOW, J.C.; YOUNG, D.W.; GOLENBOCK, D.T.; CHRIST, W.J.; GUSOVSKY, F. Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 16, p. 10689-10692, 1999.

CORRAL, L.G.; MULLER, G.W.; MOREIRA, A.L.; CHEN, T.Y.; WU, M.; STIRLING, D.; KAPLANT, G. Selection of Novel Analogs of Thalidomide with Enhanced Tumor Necrosis Factor α Inhibitory Activity. *Molecular Medicine*, v. 2, n. 4, p. 506-515, 1996.

COSTA, P.M.; COSTA, M. P.; CARVALHO, A.A.; CAVALCANTI, S.M.T.; CARDOSO, M. V.O.; OLIVEIRA FILHO, G.B.; VIANA, D.A.; FECHINE-JAMACARU, F.V.; LEITE, A.C.L.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; FERREIRA, M.P. Improvement of in vivo anticancer and antiangiogenic potential of thalidomide derivatives. *Chemico-Biological Interactions*, v. 239, p. 174-183, 2015.

COSTA, V.S.C. Avaliação da atividade antiinflamatória e toxicidade aguda e subcrônica de análogos de talidomida contendo diaminas e estrutura ftalimidica aberta.

2013. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

CRUZ-MACHADO, S.S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFκB. *Revista da biologia – Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, USP*, v. 4, p. 40-43, 2010

DANN, S.M.; SPEHLMANN, M.E.; HAMMOND, D.C.; IIMURA, M.; HASE, K.; CHOI, L.J.; HANSON, E.; ECKMANN, L. IL-6-Dependent Mucosal Protection Prevents Establishment of a Microbial Niche for Attaching/Effacing Lesion-Forming Enteric Bacterial Pathogens. *Journal of Immunology*, v. 180, n. 10, p. 6816-6826, 2008.

DIAMANTI, A.; CAPRIATI, T.; PAPADATOU, B.; KNAFELZ, D.; BRACCI, F.; CORSETTI, T.; ELIA, D.; TORRE, G. The clinical implications of thalidomide in inflammatory bowel diseases. *Expert Reviews of Clinical Immunology*. Early online, p. 1-10, 2015

DUARY, R, K.; BATISH, V, K.; GROVER, S. Immunomodulatory activity of two potential probiotic strains in LPS-stimulated HT-29 cells. *Genes & Nutrition*, v. 9, n.398, p. 2-6, 2014

EL-AARAG, B, Y, A.; KASAI, T.; ZAHRAN, M, A, H.; ZAKHARY, N, I.; SHIGEHIRO, T.; SEKHAR, S, C.; AGWA, H, S.; MIZUTANI, A.; MURAKAMI, H.; KAKUTA, H.; SENO, M. In vitro anti-proliferative and anti-angiogenic activities of thalidomide dithiocarbamate analogs. *International Immunopharmacology*, v. 21, p. 283-292, 2014

FLEGEL, W.A.; WOLPL, A.; MANNEL, D.N.; NORTHOFF, H. Inhibition of Endotoxin-Induced Activation of Human Monocytes by Human Lipoproteins. *Infection and Immunity*, v. 57, n. 7, p. 2237-2245, 1989.

FOGH, J.; TREMPE, G. Human Cell line *in vitro*. In: FOGH, J.; TREMPE, G. (Org). *EUA: Springer US*, 1975. Cap. 5, p. 115-159

FRANKS, M.E.; MACPHERSON, G.E.; FIGG, W.D. Thalidomide. *The Lancet*, v. 363, p. 1802-1811, 2004.

FURRIE, E.; MACFARLANE, S.; THOMSON, G.; GEORGE T. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*, v. 115, p. 565-574, 2005

GÜLL, I.; ALVES, P, M.; GABOR, F.; WIRTH, M. Viability of the Human Adenocarcinoma Cell Line Caco-2: Influence of Cryoprotectant, Freezing Rate, and Storage Temperature. *Scientia Pharmacoceutica*. V. 77, n. 1, p. 133-141, 2009

GUPTA, D.; TREON, SP.; SHIMA, Y.; HIDESHIMA, T.; PODAR, K.; TAI, YT.; LIN, B.; LENTZSCH, S.; DAVIES, FE.; CHAUHAN, D.; SCHLOSSMAN, RL.; RICHARDSON, P.; RALPH, P.; WU, L.; PAYVANDI, F.; MULLER, G.; STIRLING, DI.; ANDERSON, KC. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia*, v. 15, n. 12, p. 1950-61, 2011.

NG, T.H.S.; BRITTON, G.J.; HILL, E.; VERHAGEN, J.; BURTON, B.R.; WRAITH, D.C. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontier in immunology*, v. 4, art. 129, 2013.

GRÜTZ, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10- mediated immunosuppression. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 77, n. 1, p. 3-15, 2005.

HUNTER, C.A.; JONES, S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, v. 16, n. 5, p. 448-457, 2015

ITO, T.; ANDO, H.; HANDA, H. Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. *Cellular Molecular Life Science*, v. 68, n. 9, p. 1569-1579, 2011

ITO, T.; ANDO, H.; SUZUKI, T.; OGURA, T.; HOTTA, K.; IMAMURA, Y.; YAMAGUCHI, Y.; HANDA, H.. Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science*, v. 327, n. 5971, p. 1345-1350, 2010.

JANSKÝ, L.; REYMANOVÁ, P.; KOPECKÝ, J. Dynamics of Cytokine Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated by LPS or Infected by *Borrelia*. *Physiological Research*, v. 52, n. 6, p. 593-598, 2003.

JEANNY, B.; CHING, J.B.A.; LI, H.; GARDNER, E.R.; FIGG, W.D. Thalidomide analogues as anticancer drugs. *Recente Pathway Anticancer Drug Discovery*, v. 2, n. 2, p. 167-174, 2007

JUNG, H, C.; ECKMAN, L.; YANG, S.; PANJA, A.; FIERER, J.; WROBLEUSKA, E, M.; KAGNOFF, M. A Distinct Array of Proinflammatory Cytokines Is Expressed in Human Colon Epithelial Cells in Response to Bacterial Invasion. *Journal of Clinical Investigations*, v. 95, n. 1, p. 55-65, 1995

KALAMPOKIS, I.; YOSHIZAKI, A.; TEDDER, T.F. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Research & Therapy*, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2013.

KALLIOLIAS, G.D.; IVASHKIV, L.B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 12, n. 1, p. 49-62, 2015

KEIFER, J.A.; GUTTRIDGE, D.C.; ASHBURNER, B.P.; BALDWIN, A.B. Inhibition of $\text{I}\kappa\text{B}$ activity by thalidomide through suppression of $\text{I}\kappa\text{B}$ kinase activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 25, p. 22382-22387, 2001.

KESLEY, F. O. Thalidomide Uptake: Regulatory Aspects. *Teratology*, v. 38, n. 3, p. 221-226, 1988.

KIM, Y.S.; KIM, J.S.; JUNG, H.C.; SONG, I.S. The Effects of Thalidomide on the Stimulation of $\text{I}\kappa\text{B}$ Activity and $\text{TNF-}\alpha$ Production by Lipopolysaccharide in a Human Colonic Epithelial Cell Line. *Molecules and Cells*, v. 17, n. 2, p. 210-216, 2004

KIM, K.S.; SURH, C.D. Induction of Immune Tolerance to Dietary Antigens. In: SHOENBERGER, S. P.; KATSIKIS, P. D.; PULENDRAN, B. (Org). *Crossroads Between Innate and Adaptive Immunity V*, Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer, Cap. 8, 2015.

KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, v. 40, n. 7, p. 1830-1835, 2010.

KLEIN, B.; ZHAO-YANG, L.; JIANG, G.Z.; COSTES, V.; JOURDAN, M.; ROSSI, J. Interleukin-10 and Gp130 Cytokines in Human Multiple Myeloma. *Leukemia and Lymphoma*, v. 34, n. 1-2, p. 63-70, 1998.

LAMIE, P.F.; PHILOPPES, J.N.; EL-GENDY, A.O.; RAROVA, L.; GRUZ, J. Design, Synthesis and Evaluation of Novel Phthalimide Derivatives as *in Vitro* Anti-Microbial, Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*, v. 20, n. 9, p. 16620-16642, 2015.

LATIF, T.; CHAUHAN, N.; KHAN, R.; MORAN, A.; USMANI, S, Z. Thalidomide and Its analogues in the treatment of Multiple Myeloma. *Experimental Hematology & Oncology*, v. 1, n. 27, p. 1-8, 2012

LE BIVIC, A.; HIRN, M.; REGGIO, H. HT-29 cells are an *in vitro* model for the generation of cell polarity in epithelia during embryonic differentiation. *Cell Biology*, v. 85, n. 1, p. 136-140, 1988

LEE, S, K.; KIM, T, I.; KIM, Y, K.; CHOI, C, H.; YANG, K, M.; CHAE, B.; KIM, W, H. Cellular differentiation-induced attenuation of LPS response in HT-29 cells is related to the down-regulation of TLR4 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 337, n. 2, p. 457-463, 2005.

LEIBOVLTZ, A.; STLNSON, J. C.; MCCOMBS, W. B.; MCCOY, C. E.; MAZUR, K.; MABRY, N. D. Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Research* v. 36, n. 12, p. 4562-4569, 1976

LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. O Renascimento de um fármaco: talidomida. *Quimica Nova*, v. 24, n. 5, p. 683-688, 2001.

LIN, Y.; SHUN, C.; WU, M.; CHEN, C. A Novel Anticancer Effect of Thalidomide: Inhibition of Intercellular Adhesion Molecule-1 Mediated Cell Invasion and Metastasis through Suppression of Nuclear Factor- κ B. *Cancer Therapy: Preclinical*, v.12, n. 23, p. 7165-7173, 2006.

LIU, M.; GUO, S.; HIBBERT, J.M.; JAIN, V.; SINGH, N.; WILSON, N.O.; STILES, J.K. CXCL10/IP-10 in Infectious Diseases Pathogenesis and Potential Therapeutic Implications. *Cytokine Growth Factor Reviews*, v. 22, n. 3, p. 121–130, 2011.

LIU, Q.; LI, A.; TIAN, Y.; WU, J.D.; LIU, Y.; LI, T.; CHEN, Y.; HAN, X.; WU, K. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 31, p. 61-71, 2016.

LU, B.Z.Y.; ZHANG, X.G.; RODRIGUES, C.; WIJDENES, J.; GU, Z.; MOREL-FOURNIER, B.; HAROUSSEAU, J.L.; BATAILLE, R.; ROSSI, J.G.; KLEIN, B. Interleukin-10 Is a Proliferation Factor But Not a Differentiation Factor for Human Myeloma Cells. *Blood Journal*, v. 85, p. 2521-2527, 1995.

LYER, S.S.; CHENG, G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Critical Reviews in Immunology*, v. 32, n. 1, p. 23–63, 2012.

MANOUSOU, P.; KOLIOS, G.; DRYGIANNAKIS, I; PYROVOLAKI, K.; BOURIKAS, L.; PAPADAKI, H, A.; KOUROUMALIS, E. Expression of a splice variant of CXCR3 in Crohn's disease patients; indication for a Lymphocyte—epithelial cell interaction. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* v. 23, n. 12, p. 1823-1833, 2008.

MARRIOTT, J. B.; WESTBY, M.; COOKSON, S.; GUCKIAN, M.; GOODBOURN, S.; MULLER, G.; SHIRE, M. G.; STIRLING, D.; DALGLEISH, A. CC-3052: A Water-Soluble Analog of Thalidomide and Potent Inhibitor of Activation-Induced TNF- α Production. *Journal of Immunology*, v. 161, n. 8, p. 4236-4243, 1998.

MAZZOCOLI, L.; CADOSO, S.H.; AMARANTE, G.W.; SOUZA, M.V.N.; DOMINGUES, R.; MACHADO, M.A.; ALMEIDA, M.V.; TEIXEIRA, H.C. Novel thalidomide analogues from diamines inhibit pro-inflammatory cytokine production and CD80 expression while enhancing IL-10. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 66, n. 5, p. 323–329, 2012.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, JR.C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, v. 173, p. 89–97, 2000.

MIHARA, M.; HASHIZUME, M.; YOSHIDA, H.; SUZUKI, M.; SHIINA, M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, v. 122, p. 143–159

MOSSER, D.M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological Review*, v. 226, p. 205-218, 2008.

MULLER, G.W.; CHEN, R.; HUANG, S.; CORRAL, L.G.; WONG, L.M.; PATTERSON, R.T.; CHEN, Y.; KAPLAN, G.; STIRLING, D. Thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF- α production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 9, n. 11, p. 1625-1630, 1999.

MULLER, G.W.; CORRAL, L.G.; SHIRE, M.G.; WANG, H.; MOREIRA, A.; KAPLAN, G.; STIRLING, D.I. Structural Modifications of Thalidomide Produce Analogs with Enhanced Tumor Necrosis Factor Inhibitory Activity. *Journal of Medicine Chemistry*, v. 39, n. 17, p. 3238–3240, 1996.

OLIVEIRA, M, A.; BERMUDEZ, J, A, Z.; SOUZA, A, C, S. Talidomida no Brasil: vigilância com responsabilidade compartilhada? *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 99-112, 1999.

OLIVEIRA, M, P. Análise in vitro da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) - Universidade Pontifícia Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre.

PALSSON-MCDERMOTT, E.M.; O'NEILL, L.A.J. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, v. 113, n. 2, p. 153-162, 2004.

PAPASEIT, E.; GARCÍA-ALGAR, O.; FARRÉ, M. Talidomida: una historia inacabada. *Anales Pediatría (Barcelona)*, v. 78, n. 5, p. 283-287, 2013.

RAJIAH, R.; PERKINSA, D.J.; IRELAND, D.D.C.; VOGELA, S.N. CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin tolerance. *PNAS*, v. 112, n. 27, p. 8391-8396, 2015.

RINCON, M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Cell Press*, v. 33, n. 11, p. 571-577, 2012.

ROGLER, G.; ANDUS, T. Cytokines in Inflammatory Bowel Disease. *World Journal of Surgery*, v. 22, n. 4, p. 382-389, 1998.

ROUSSET, M. The human colon carcinoma cell lines HT-19 and Caco-2: two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, v. 68, n. 9, p. 1035-1040, 1986.

ROWLAND, T.L.; MCHUGH, S.M.; DEIGHTON, J.; DEARMAN, R.J.; EWAN, P.W.; KIMBER, I. Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacology*, v. 40, n. 1, p. 11-20, 1998.

RUSSO, R, C.; GARCIA, C, C.; TEIXEIRA, M, M.; AMARAL, F, A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Experts Reviews in Clinical Immunology* Early online, v. 10, n. 5, p. 1-27, 2014.

SAMPAIO, E.P.; SARNO, E.N.; GALILLY, R.; COHN, Z.A.; KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 173, n. 3, p. 699-703, 1991

SAMPAIO, E.P.; CARVALHO, D.S.; NERY, J.A.C.; LOPES, U.G.; SARNO, E.N. Thalidomide: An Overview of its Pharmacological Mechanisms of Action. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, v. 5, n. 1, p. 71-77, 2006.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews*, v. 10, p. 1-12, 2010.

SASTRY, P. S. R. K. Inhibition of TNF- α synthesis with thalidomide for prevention of acute exacerbations and altering the natural history of multiple sclerosis. *Medical Hypotheses*, v. 53, n. 1, p. 76-77, 1999.

SHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1813, p. 878-888

SCHUMACHER, H.; SMITH, R.L.; WILLIAMS, R.T. The metabolism of thalidomide: the spontaneous hydrolysis of thalidomide. *British journal of Pharmacology*, v. 25, n. 2, p. 324-337, 1965

SHANNON, E.; NOVECK, R.; SANDOVAL, F.; KAMATH, B. Thalidomide Suppressed IL-1 β While Enhancing TNF- α and IL-10, When Cells in Whole Blood were Stimulated with Lipopolysaccharide. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 30, n. 3, p. 447-57, 2008.

SIEDNIENKO, J.; MIGGIN, S.M. Expression Analysis of the Toll-Like Receptors in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Methods in Molecular Biology, Toll-Like Receptors*, v. 517, p. 3-14, 2009.

SILVEIRA, J.D.C. Avaliação dos Efeitos Imunomoduladores e Citotóxicos de Polissacarídeos de *Chorisia speciosa* e *Hymenaea courbaril*. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba

SINGH, U.P.; SINGH, N.P.; MURPHY, E.A.; PRICE, R.L.; FAYAD, R.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P.S. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine* v. 77, p. 44–49, 2015.

SOUBA, W. W. Cytokine control of nutrition and metabolism during critical illness. *Current Problems in Surgery*, v. 31, n. 7, p. 582-586, 1994

SUNIL, Y.; RAMADORI, G.; RADDATZ, D. Influence of NF κ B inhibitors on IL-1 β -induced chemokine CXCL8 and -10 expression levels in intestinal epithelial cell lines: glucocorticoid ineffectiveness and paradoxical effect of PDTTC. *International Journal of Colorectal Disease*, v. 25, n. 3, p. 323-333, 2010.

TOSI, M.F. Innate immune responses to infection. *Current reviews of allergy and clinical immunology*, v. 116, n. 2, p. 241-249, 2005.

TURK, B, E.; JIANG, H.; LIU, J, O. Binding of thalidomide to α 1-acid glycoprotein may be involved in its inhibition of tumor necrosis factor a production. *Proceedings National Academy Science*, v. 93, n. 15, p. 7552-7556, 1996.

VAZIRINEJAD, R.; AHMADI, Z.; ARABABADI, M.K.; HASSANSHAHI, G.; KENNEDY, D. The biological functions, structure and sources of CXCL10 and its outstanding part in the pathophysiology of multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation*, v. 21, n. 6, p. 322-330

YANG, C.; SINGH, P.; SINGH, H.; LE, M.-L.; EL-MATARY, W. Systematic review: thalidomide and thalidomide analogues for treatment of inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 41, n. 11, p. 1079-1093, 2015.

YE, Q.; CHEN, B.; TONG, Z.; NAKAMURA, S.; SARRIA, R.; COSTABEL, U.; GUZMAN, J. Thalidomide reduces IL-18, IL-8 and TNF- α release from alveolar macrophages in interstitial lung disease. *European Respiratory Journal*, v. 28, n. 4, p. 824-831, 2006

YERUVA, S.; RAMADORI, G.; RADDATZ, D. NF-kappaB-dependent synergistic regulation of CXCL10 gene expression by IL-1beta and IFN-gamma in human intestinal epithelial cell lines. *International Journal Colorectal Disease*, v. 23, n. 3, p. 305-317, 2008.

YUE, F. Y.; DUMMER, R.; GEERTSEN, R.; HOFBAUER, G.; LAINE, E.; MANOLIO, S.; BURG, G. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-

regulates HLA class-i, HLA class-ii and ICAM-1 molecules. *Int. J. Cancer*, v. 71, n. 4, p. 630-637, 1997.

ZANONI, I.; OSTUNI, R.; MAREK, L.R.; BARRESI, S.; BARBALAT, R.; BARTON, G.M.; GRANUCCI, F.; KAGAN, J.C. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like Receptor 4. *NIH Public Access*, v. 147, n. 4, p. 868-880, 2012.

<https://www.atcc.org/Products/All/HTB-37.aspx>

<https://www.atcc.org/products/all/HTB-38.aspx>

APÊNDICES

APÊNDICE A - Determinação da densidade de inoculação e tempo de cultivo para subconfluência das células T-29

Afim de estabelecer as densidades de inoculações e tempo de cultivo que garantam culturas de células em sub-confluência para os experimentos, as células HT-29 foram semeadas em placas de 24 poços (Costar®). Foram testadas duas concentrações diferentes (5×10^4 células.mL⁻¹ e 10^5 células.mL⁻¹). As culturas foram avaliadas diariamente, por microscopia óptica, sendo cultivadas por 7 dias para a aquisição de sub-confluência e integridade da camada de células.

Fo observado que embora ambas as concentrações tenham sido eficientes para a sub-confluência das células, devido a sua taxa de divisão acentuada, a concentração inicial de 5×10^4 células.mL⁻¹ (Figura 23) permitiu a formação da camada de células e esta se encontrava íntegra e aderida à placa. Na concentração inicial de 10^5 células.mL⁻¹ foram observadas múltiplas camadas de células, não sendo possível, desta forma, avaliar a integridade das mesmas. Também observamos que nesta concentração de células, um período maior que 7 dias era prejudicial para a integridade da monocamada, causando o desprendimento das mesmas.

Na densidade considerada ideal (5×10^4 células.mL⁻¹), as células foram tratadas com uma solução de tripsina (0,25%, 400µl/poço) e EDTA (1mM) (Sigma®), e isoladas após incubação a 37°C por 3 minutos. Em seguida, as células, foram destacadas da placa, centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos, em centrífuga refrigerada (4°C) e o pellet ressuspendido em meio para a contagem em câmara de Neubauer, utilizando Trypan blue. A média das contagens de cada poço foi utilizado para determinação da concentração final de células a serem usadas nos experimentos.

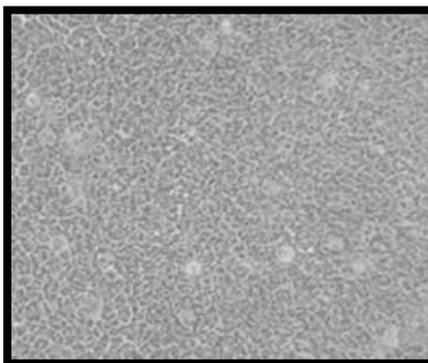


Figura 23 Microscopia óptica da cultura de células de adenocarcinoma colorretal humano, HT-29 cultivadas por 7 dias em placas de 24 poços nas concentrações iniciais de 5×10^4 células.mL⁻¹.

APÊNDICE B - Padronização de estímulos pró-inflamatórios às células HT-29, utilizando LPS e IFN- γ

As células HT-29 foram testadas para sua habilidade em responder a estímulo pró-inflamatório pela análise da indução da produção de mediadores inflamatórios. Para isso, as células HT-29 foram semeadas em placas de 24 poços com densidade de 5×10^4 células.mL⁻¹. Após o período para aquisição de sub-confluência de 7 dias, as células receberam os seguintes estímulos: LPS (0111:B4) (250ng.mL⁻¹, 500ng.mL⁻¹ e 1 μ g.mL⁻¹), IFN- γ (0,4ng.mL⁻¹ e 10ng.mL⁻¹) e as combinações variadas de LPS (250ng.mL⁻¹, 500ng.mL⁻¹ e 1 μ g.mL⁻¹) + IFN- γ (0,4ng.mL⁻¹ e 10ng.mL⁻¹) (YERUVA, RAMADORI e RADDATZ, 2008). Após 18 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% CO₂, os sobrenadantes foram coletados e utilizados para determinação da produção de CXCL-10 por meio de ensaio imunoenzimático (R&D DuoSet® ELISA) de acordo com o fabricante. As placas foram lidas a 450nm usando leitor de ELISA (Spectramax-190, Molecular Devices).

Podemos observar elevada produção de CXCL-10 quando o LPS foi utilizado nas concentrações de 250ng.mL⁻¹ e 500ng.mL⁻¹ ($p < 0,01$) enquanto na concentração de 1 μ g.mL⁻¹ não houve diferença significativa na produção em relação a ausência de estímulo (grupo controle) (figura 24A). Também podemos verificar que na concentração de 0,4ng.mL⁻¹ de IFN- γ não foi detectada produção de CXCL-10, enquanto que na concentração de 10ng.mL⁻¹ IFN- γ foi essa produção foi detectada ($p < 0,05$) (figura 24B). Nas figuras 24C e 24D podemos observar a produção de

CXCL-10 em resposta aos estímulos combinados LPS (250ng.mL^{-1}) + IFN- γ ($0,4\text{ng.mL}^{-1}$) ($p<0,05$), LPS (250 e 500ng.mL^{-1}) + IFN- γ (10ng.mL^{-1}) ($p<0,01$) e LPS ($1\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IFN- γ (10ng.mL^{-1}) ($p<0,05$), sendo que esta última associação levou a uma produção de CXCL-10 4,12 vezes maior que o estímulo somente de LPS na mesma concentração.

O LPS na concentração de 250ng.mL^{-1} foi escolhido como estímulo para os experimentos posteriores, uma vez que a produção de CXCL-10 frente ao estímulo com 500ng.mL^{-1} LPS não apresentou diferença significativa em relação ao LPS 250ng.mL^{-1} , e o estímulo LPS $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ com IFN- γ 10ng.mL^{-1} apresentou uma menor produção da quimiocina quando comparado aos outros estímulos.

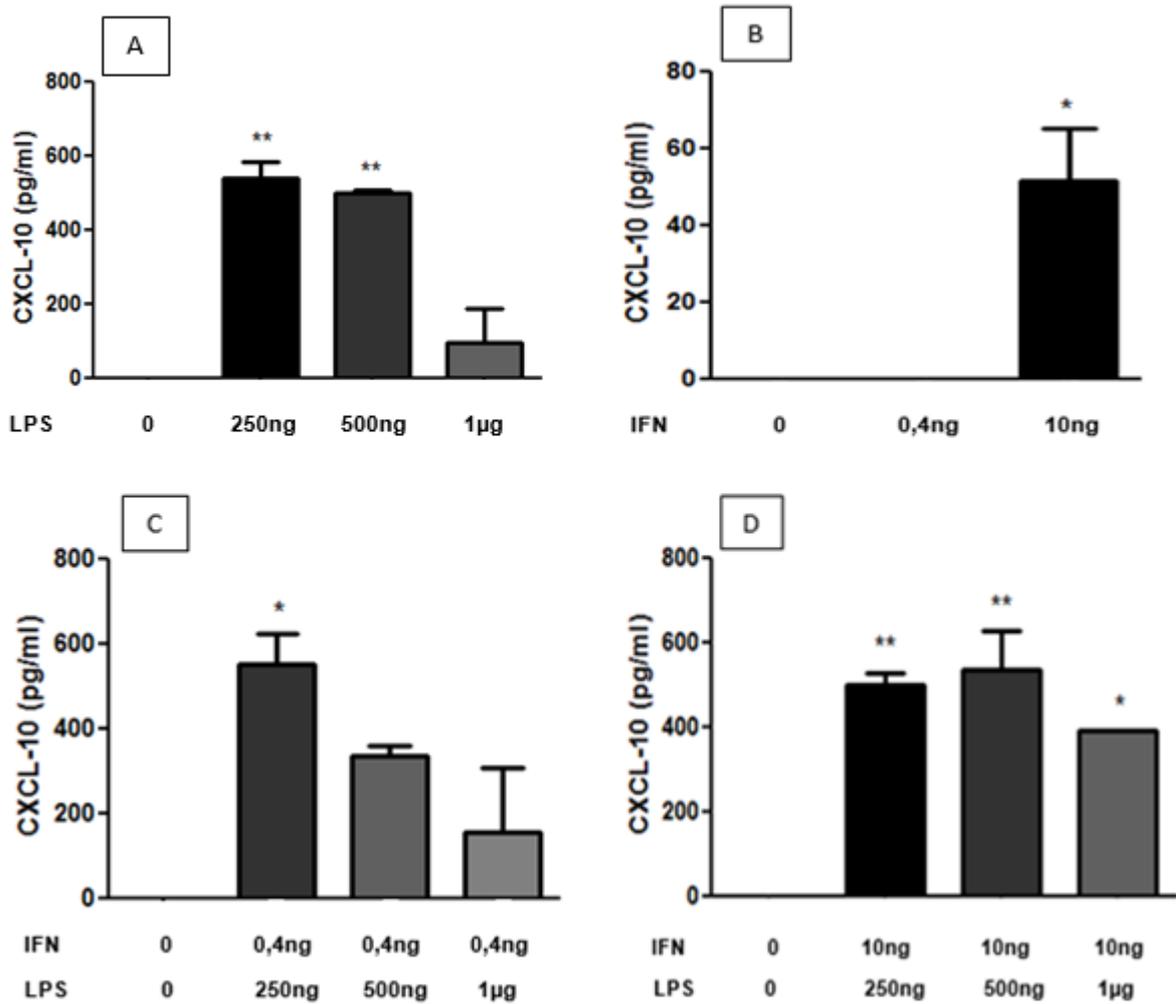


Figura 24 Produção de CXCL-10 (pg/ml) por células HT-29 18 horas após estímulo com concentrações crescentes de **(A)** LPS (250ng/ml, 500ng/ml e 1µg/ml), **(B)** IFN- γ (0,4ng/ml e 10ng/ml) e **(C e D)** combinações variadas de LPS (250ng/ml, 500ng/ml e 1µg/ml) + IFN- γ (0,4ng/ml e 10ng/ml). A produção de CXCL-10 foi avaliada pelo método ELISA. Os dados foram expressos como média \pm SEM, utilizando o teste ANOVA, com teste de Tukey como pós teste. * = $p < 0,05$ versus controle não estimulado, ** = $p < 0,01$ versus controle não estimulado.