

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
IMUNOLOGIA, GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

**Luciano Mazzocoli**

**AVALIAÇÃO DE NOVOS ANÁLOGOS DA TALIDOMIDA QUANTO A  
INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO, CITOCINAS PRÓ-  
INFLAMATÓRIAS E EXPRESSÃO DE CD80 E CD86 EM  
MACRÓFAGOS**

Juiz de Fora  
2009

**LUCIANO MAZZOCOLI**

**AVALIAÇÃO DE NOVOS ANÁLOGOS DA TALIDOMIDA QUANTO A  
INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO, CITOCINAS PRÓ-  
INFLAMATÓRIAS E EXPRESSÃO DE CD80 E CD86 EM  
MACRÓFAGOS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

**Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira**

Juiz de Fora  
2009

**LUCIANO MAZZOCOLI**

**AVALIAÇÃO DE NOVOS ANÁLOGOS DA TALIDOMIDA QUANTO A  
INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO, CITOCINAS PRÓ-  
INFLAMATÓRIAS E EXPRESSÃO DE CD80 E CD86 EM  
MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora Aprovada pela Banca Examinadora composta por:

---

Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira - Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Euzenir Nunes Sarno - Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidia Moreira Lima - Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ferreira - Universidade Federal de Juiz de Fora

Dissertação defendida em 29 de abril de 2009.

Dedico este trabalho aos meus pais João Batista e Eudália que sempre me apoiaram e incentivaram a lutar pelos meus ideais com paciência e tolerância e aos meus irmãos Leonardo e Taura por tornarem minha trajetória emocionante. Dedico também à minha namorada Marisley pelo companheirismo, compreensão e paciência dos quais serei grato por toda a vida.

“Dar o exemplo não é a melhor maneira  
de influenciar os outros. É a única.”

Albert Schweitzer

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por permitir que eu trabalhasse com formas tão belas de vida.

Aos meus pais João Batista Mazzoccoli e Maria Eudália Mazzoccoli pelo exemplo de vida, apoio incondicional, pelos ensinamentos morais, por acreditarem sempre no meu potencial e pelas orações infindáveis.

À minha namorada Marisley, pelo exemplo de dedicação ao trabalho, por tolerar os meus defeitos e por acreditar que a minha dedicação é para a busca de um futuro melhor.

Ao meu Professor e orientador Henrique Couto Teixeira pela orientação científica, pelo incentivo e paciência.

Aos Professores Mauro Vieira Almeida e Silvia Cardoso pelo apoio e pela inestimável atenção sempre no momento em que precisei.

Às Professoras Ana Paula Ferreira e à Maria Aparecida de Souza (Cida) pelo carinho, pelas sábias instruções e por ajudarem na solução de problemas que surgiram.

À Professora Michele Mendes Barsante o meu eterno agradecimento pelas sugestões as quais permitiram grandes progressos.

Ao Professor Waldiceu Verri Jr pela atenção e importantes esclarecimentos.

Aos companheiros do laboratório de imunologia, Bruno, Matheus, Suelen, Alice, Michele Rodrigues, Lívia, Alyrya, Bianca, Michele Vicentini, Isabelly, Ana Maria, Juliana, Márcio, Alessa, e principalmente ao Caio, Carol, Sandra e Francisco (Chico) por me auxiliarem quando precisei. Todos fazem parte de um momento muito especial em minha vida.

Às Professoras Clarice Abramo e Elaine Soares Coimbra por permitirem que eu utilizasse o laboratório de Parasitologia em momentos importantes.

Ao Professor Marco Antônio Machado por permitir que eu utilizasse o laboratório de Biologia Molecular da Embrapa e a realizar um antigo sonho e ao meu amigo Robert Domingues e a Isabella pelo inestimável auxílio para realização de técnicas importantes.

Aos meus amigos Ana Márcia Mattos, Diego Pandeló, Vanessa Vieira e Ana Paula Pessoa por compartilharem sábias palavras e atenção nos momentos de dificuldade vivenciados.

À Tenille e ao Matheus do CRITT pela paciência e atenção disponibilizadas para elaboração de uma importante etapa do meu trabalho.

À CAPES, ao CNPQ e à FAPEMIG pelo suporte financeiro fornecido ao projeto.

A todos que colaboraram com a realização deste trabalho meu fervoroso muito obrigado!

## RESUMO

A talidomida é utilizada no tratamento de diversas doenças incluindo o eritema nodoso leproso (ENL), uma complicação inflamatória da Hanseníase. Contudo, apresenta atividade teratogênica severa e novos análogos podem ser usados no tratamento da doença sem apresentar este efeito colateral. Uma série de compostos diamínicos contendo duas subunidades ftalimídicas abertas foram escolhidos como análogos da talidomida. Nossos resultados mostram que compostos contendo dois grupos ftalimídicos podem ser facilmente obtidos em elevada quantidade através da condensação de anidrido ftálico ou anidrido 3-nitroftálico com diferentes diaminas comercialmente disponíveis. O efeito destes compostos na produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e NO, e na expressão de CD80 e CD86 em células J774A.1 estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$  foi investigado. O nível de mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e iNOS em J774A.1 foi analisado por RT-PCR em tempo real. Células do sangue periférico humano (PBMC) foram usadas para avaliar a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , CXCL9 e CXCL10. A produção de citocinas foi avaliada por ELISA, a produção de NO pelo método de Griess, e a expressão de CD80, CD86, CXCL9 e CXCL10 por citometria de fluxo. As células J774A.1 foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos (entre 1 a 880  $\mu$ M) e após 1h foram estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/ml) e IFN- $\gamma$  (0,4 ng/ml) por 18h. PBMC humano foi incubado de forma similar e estimulado com LPS (2  $\mu$ g/ml). Três compostos inibiram de forma elevada a produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO, conquanto que aumentaram a produção de IL-10. Além disto, inibiram a expressão de CD80, mas não de CD86. Os resultados analisados por RT-PCR em tempo real indicaram que esses compostos atuaram em eventos pós-transcricionais. Os compostos *N, N'*-Di-(2-carboxi-benzoil)-1,3-propanodiamina, *N, N'*-Di-(2-carboxi-3-nitro-benzoil)-1,2-etilenodiamina e *N, N'*-Di-(2-carboxi-3-nitro-benzoil)-1,6-hexanodiamina inibiram mais a produção de TNF- $\alpha$  do que a talidomida ( $IC_{50}$  de 55 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 6,1 $\mu$ M e 220 $\mu$ M, respectivamente) e também tiveram efeito inibitório na produção de IFN- $\gamma$ , IL-6, CXCL9 e CXCL10. Os compostos não tiveram efeito na viabilidade celular avaliada por azul de Trypan e por MTT. Este trabalho mostra a síntese e caracterização de novos análogos da talidomida, obtidos em bom rendimento utilizando metodologia simples. Nossos resultados sugerem que a potencial atividade anti-inflamatória e imunorregulatória destes compostos diamínicos apresentam potencial aplicação no tratamento de ENL e outras doenças.

Palavras-chave: análogos da talidomida, macrófagos, atividade anti-inflamatória, citocinas, NO, CD80.



## ABSTRACT

Thalidomide is used to treat various diseases including erythema nodosum leprosum (ENL), an inflammatory complication of leprosy. However, it has severe teratogenic activity and novel thalidomide analogues might be used to treat the disease without this severe side effect. A series of diamine compounds containing two hydrolyzed phthalimido structures were chosen as analogues of thalidomide. Our results show that compounds bearing two phthalimido units could easily be obtained in high yield by condensation of phthalic or 3-nitrophthalic anhydride with the different diamines commercially available. The effects of these compounds on production of TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 and NO, and on expression of CD80 and CD86 in LPS/IFN- $\gamma$  stimulated J774A.1 cells were investigated. The level of TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 and iNOS mRNA in J774A.1 was analyzed by real time RT-PCR. Human peripheral blood (PBMC) was used to evaluate TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CXCL9 and CXCL10 production. Cytokine production was evaluated by ELISA, NO production by the Griess assay, and CD80, CD86, CXCL9 and CXCL10 expression by cytometry. J774A.1 cells were incubated with different concentrations of the compounds (between 1 and 880  $\mu$ M) and after 1h stimulated with LPS (1  $\mu$ g/ml) and IFN- $\gamma$  (0,4 ng/ml) for 18h. Human PBMC were similarly incubated with the compounds and stimulated by LPS (2  $\mu$ g/ml). Three compounds greatly inhibited TNF- $\alpha$ , IL-12 and NO production while enhancing IL-10. In addition, CD80 expression was inhibited, but not CD86. The result analyzed by real time RT-PCR indicates that these compounds act in the blocking of post-transcriptional events. The compounds N, N'-Di-(2-carboxy-benzoyl)-1,3-propanediamine, N, N'-Di-(2-carboxy-3-nitro-benzoyl)-1,2-ethylenediamine e N, N'-Di-(2-carboxy-3-nitro-benzoyl)-1,6-hexanediamine inhibited TNF- $\alpha$  production by PBMC greater than thalidomide ( $IC_{50}$  de 55 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 6.1 $\mu$ M and 220 $\mu$ M, respectively) and also had a inhibitory effect on IFN- $\gamma$ , IL-6, CXCL9 and CXCL10 production. The compounds had no effect on cell viability, evaluated by Trypan blue exclusion and MTT assay. This work describes the synthesis and characterization novel thalidomide analogues, prepared in good yields using simple methodology. Our results suggest that the potential anti-inflammatory and immunomodulatory activity of these diamine compounds is potentially applicable in treating ENL and other diseases.

Keywords: thalidomide analogs, macrophage, anti-inflammatory activity, cytokine, NO, CD80.

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Resumo das características dos análogos quanto ao espaçamento, diluição e grupos presentes nas moléculas. ....	43
Tabela 1	Concentração de <i>primer</i> e temperatura de dissociação (TD) de cada gene analisado. ....	52
Tabela 2	Eficiência (E) e coeficiente de correlação (r) das curvas padrão de cada gene analisado. ....	54
Tabela 3	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados nos ensaios de PCR convencional e PCR em tempo real ....	54
Tabela 4	Produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, NO e IL-10 por células J774A.1 ativadas por LPS/IFN- $\gamma$ : efeito do tratamento com talidomida e seus análogos .....	63
Tabela 5	Efeito citotóxico da talidomida e seus análogos em células L1210 .....	64
Tabela 6	Efeito do tratamento com talidomida e seus análogos na expressão relativa da produção de mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-12, iNOS e IL-10 em células J774A.1 estimuladas por 2 h com LPS/IFN- $\gamma$ .....	67
Tabela 7	Efeito do tratamento com talidomida e seus análogos na expressão relativa da produção de mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-12, iNOS e IL-10 em células J774A.1 estimuladas por 6 h com LPS/IFN- $\gamma$ .....	68
Tabela 8	Inibição da produção de TNF- $\alpha$ induzidas por LPS em PBMC humano tratadas com talidomida e seus análogos.....	70
Tabela 9	Inibição da produção de IL-6, IFN- $\gamma$ , CXCL10 e CXCL9 por PBMC humano estimuladas com LPS e tratadas com talidomida e seus análogos .....	71

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação estrutural da talidomida e glutetimida .....	21
Figura 2	Representação estrutural dos grupamentos da talidomida e dos seus enantiômeros .....	22
Figura 3	Principais metabólitos <i>in vivo</i> da talidomida. ....	23
Figura 4	Representação estruturas das bases nitrogenadas do DNA. ....	36
Figura 5	Representação estrutural da talidomida .....	40
Figura 6	Representação da estrutura molecular dos análogos utilizados.....	44
Figura 7	Representação das reações de síntese dos análogos da talidomida .....	45
Figura 8	Curva de dissociação do gene HPRT.....	53
Figura 9	Curva de Dissociação do gene TNF- $\alpha$ . ....	53
Figura 10	Produção de NO por macrófagos J774A.1 .....	57
Figura 11	Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO em sobrenadantes de culturas de macrófagos J774 A.1. ....	58
Figura 12	Avaliação do efeito do DMSO na citotoxicidade e na produção de TNF- $\alpha$ por células J774 A.1. ....	60
Figura 13	Efeitos dos análogos na produção de IFN- $\gamma$ por células L1210.....	64
Figura 14	Avaliação da expressão da molécula co-estimulatória CD80 na superfície de células J774A.1 estimuladas. ....	65
Figura 15	Avaliação da expressão da molécula co-estimulatória CD86 na superfície de células J774A.1 estimuladas .....	66

## ABREVIATURAS, SIGLAS E CÓDIGOS

$\alpha$ 1-AGP	“Alpha 1-acid glycoprotein” / Alfa 1-glicoproteína ácida
$\kappa$ B	Cadeia leve <i>kappa</i> das moléculas de anticorpo das células B
$\mu$ g	micrograma
$\mu$ l	microlitro
$\mu$ M	micromolar
AIDS	“Acquired immune deficiency syndrome” / Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	“Antigen-presenting cell” / Células apresentadoras de antígeno
BALF	Lavado bronco alveolar
bFGF	“Basic fibroblast growth factor” / Fator de crescimento de fibroblasto beta
BMSC	“Bone marrow stromal cells” / Células do estroma da medula óssea
C	Controle estimulado
cAMP	“Cyclic adenosine 3',5'-cyclic monophosphate” / Adenosina 3', 5'-cíclica monofosfato
CBA	“Cytometric bead array” / Ensaio citométrico de esferas ordenadas
CD	“Cluster of differentiation” / Moléculas expressas na superfície de leucócitos
cGMP	“Cyclic guanosine monophosphate” / Guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato
c-IAP2	“Cellular inhibitor of apoptosis proteins 2” / Proteína 2 inibidora de apoptose
COX	Ciclooxigenase
Ct	“Cycle threshold” / Ciclo onde a reação atinge o limiar de detecção
CXCR3	Receptor das quimiocinas CXCL9 e CXCL10
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	“Deoxyribonucleic acid” / Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
ELISA	“Enzyme linked Immunosorbent assay” / Ensaio de absorção imunoenzimático
ENL	Eritema nodoso leproso

eNOS	“Endothelial nitric oxide synthase” / Óxido nítrico sintase endotelial
FDA	“Food and Drug Administration” / Administração de drogas e alimentos
HIV	“Human immunodeficiency virus” / Vírus da imunodeficiência humana
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase
hTERT	“Human telomerase reverse transcriptase” - Transcriptase reversa da telomerase humana
HuR	“Human-antigen R” / Antígeno humano R
HUVEC	“Human umbilical vein endothelial cells” / Células endoteliais de veias umbilicais humanas
I $\kappa$ B	Inibidor de Kappa B
IKK	Enzima inibidora de <i>kappa</i> B
IC <sub>50</sub>	Concentração molar que inibe 50% da produção de citocina
IFM	Intensidade de fluorescência média
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
IMiDs	“Immunomodulatory drugs” / Drogas imunomodulatórias
iNOS	“inducible nitric oxide synthase” / Óxido nítrico sintase induzida
IP-10/CXCL10	“Interferon-gama inducible protein 10” CXCL10 / Proteína induzida por interferon-gama-10
LE	Lupus eritematoso
LNMA	“NG-monomethyl-L-arginine” / L-NG-monometil arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfócitos T
MCP-1	“Monocyte chemotactic protein-1” – CCL2 / Proteína quimiotática de monócito
mg	miligrama
MHC	“Major histocompatibility complex” / Complexo de histocompatibilidade principal
MIG/CXCL9	“Monokine induced by interferon-gama” – CXCL9 / Monocina Induzida pelo interferon-gama
min	minutos
ml	mililitro
MM	Mieloma múltiplo

mM	milimolar
mRNA	“Messenger ribonucleic acid” / Ácido ribonucleico mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NEMO	Modificador essencial de NF $\kappa$ B
NF- $\kappa$ $\beta$	“Nuclear factor- $\kappa$ B” / Fator nuclear- $\kappa$ B
NH <sub>2</sub>	Grupo amina
NK	“Natural killers cells” / Células matadoras naturais
nNOS	“neuronal nitric oxide synthase” / Óxido nítrico sintase neural
NO	“Nitric oxide” / Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	Grupo nitro
NOS	“Nitric oxide synthase” / Óxido nítrico sintase
p38MAPK	“p38 mitogen-activated protein kinase” / Proteína quinase ativada por mitógeno p38
PBMC	“Peripheral blood mononuclear cells” / Células mononucleares do sangue periférico
PBS	“Phosphate buffered saline” / Salina tamponada com fosfato
PDE	“Phosphodiesterase” / Fosfodiesterase
PGE2	Prostaglandina E2
PHA	“Phytohemagglutinin” / Fitohemaglutinina
RANTES/CCL5	“Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted” – CCL5 / Regulada por ativação, expressa e secretada por células T normais
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	“Reverse transcription polymerase chain reaction” / Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
SAC	<i>Staphylococcus aureus</i> linhagem Cowan
SelCiD	“Selective cytokine inhibitory drugs” / Drogas inibidoras seletivas de citocinas
SFB	Soro fetal bovino
SKSD	“Streptokinase-streptodornase” / Estreptocinase-estreptodornase
TCR	“T cell receptor” / Receptor de linfócitos T
TD	Temperatura de dissociação

TGF- $\beta$	“Transforming growth factor beta” / Fator de transformação do crescimento-beta
Th	“T helper 1” / célula T auxiliadora
THP-1	“Human acute monocytic leukemia cell line” / Linhagem de células monocítica leucêmicas humanas
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alpha
TPA	“Tetradecanoylphorbol acetate” / Acetato de tetradecanoilforbol
TRAIL	“TNF-related apoptosis-inducing ligand” / Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
VEGF	“Vascular endothelial growth factor” / Fator de crescimento vascular endotelial

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1. Histórico da talidomida .....	19
1.2. Características químicas e farmacológicas da talidomida .....	21
1.3. Efeitos da talidomida na produção de citocinas.....	23
1.4. Efeitos da talidomida na produção de NO .....	26
1.5. Efeitos da talidomida na produção de quimiocinas.....	26
1.6. Efeito da talidomida na ativação de células T.....	28
1.7. Efeito da talidomida na angiogênese.....	29
1.8. Mecanismo de ação da talidomida na inibição da resposta imune.....	31
1.8.1. Ação da talidomida na ativação do NF- $\kappa$ B .....	31
1.8.2. Ação da talidomida sobre o RNA mensageiro .....	32
1.8.3. Ação da talidomida sobre a produção de alfa 1-glicoproteína ácida.....	33
1.8.4. Ação da talidomida sobre a produção de PDE-4.....	33
1.8.5. Ação da talidomida induzindo a apoptose .....	34
1.8.6. Ação da talidomida na expressão gênica .....	35
1.9. Perspectiva dos estudos com a talidomida.....	36
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
2.1. Objetivo geral.....	41
2.2. Objetivos específicos.....	41
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
3.1. Análogos utilizados nos experimentos.....	42
3.2. Cultura e estimulação de células J774A.1 e de células L1210.....	46
3.3. Cultura e estimulação de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC).....	47
3.4. Determinação da produção de óxido nítrico (NO).....	47
3.5. Avaliação da viabilidade celular.....	48
3.6. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) .....	49
3.7. Citometria de fluxo.....	49
3.8. Técnica de CBA.....	49
3.9. Avaliação da expressão de CD80 e CD86 em J774A.1 através de citometria de fluxo .....	50
3.10. Extração de RNA total de células J774A.1, síntese da primeira fita de cDNA, PCR e RT-PCR em tempo real .....	51



3.11. RT-PCR em tempo real dos genes TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e iNOS.....	54
3.12. Análise estatística.....	56
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
4.1. Padronização dos estímulos para avaliação da ativação de células J774A.1 .....	57
4.2. Cinética da produção do TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO por células J774A.1 estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$ .....	58
4.3. Avaliação do efeito do DMSO na citotoxicidade e produção de TNF- $\alpha$ em células J774A.1 .....	59
4.4. Avaliação do efeito dos análogos da talidomida na produção de citocinas por células J774A.1 .....	60
4.4.1. Efeito da talidomida e dos compostos na produção de TNF- $\alpha$ por células J774A.1 .....	61
4.4.2. Efeito da talidomida e dos compostos na produção de IL-12 por células J774A.1 .....	61
4.4.3. Efeito da talidomida e dos compostos na produção de NO por células J774A.1 .....	62
4.4.4. Efeito da talidomida e dos compostos na produção de IL-10 por células J774A.1 .....	62
4.5. Avaliação do efeito dos análogos da talidomida em células L1210 .....	63
4.6. Avaliação da influência dos compostos 3, 2' e 6' na expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 em células J774A.1 .....	65
4.7. Efeito dos análogos da talidomida na expressão do mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e iNOS por células J774A.1 estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$ .....	67
4.8. Avaliação do efeito dos análogos na ativação de PBMC humano.....	69
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
5.1. Inibição da produção de TNF- $\alpha$ por células J774A.1 e células do sangue periférico humano tratadas com os análogos da talidomida .....	72
5.2. Efeito dos análogos da talidomida na produção de IL-12, IL-10 e NO por células J774A.1 .....	75
5.3. Efeito dos compostos no acúmulo de mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e iNOS em células J774A.1.....	77

5.4. Efeito dos compostos na expressão das moléculas CD80 e CD86 em células J774A.1 .....	81
5.5. Efeito dos compostos na produção de IFN- $\gamma$ em PBMC humano e em células L1210 .....	83
5.6. Efeito dos análogos da talidomida na produção de IL-6 e quimiocinas CXCL9, CXCL10 por PBMC humano .....	84
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>86</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>88</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1. 1. Histórico da talidomida

A talidomida, [(±)-N-(2,6-dioxo-3-piperidinil)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona ou (±)-ftalimidoglutarimida (Fig. 1a)], análogo estrutural da glutetimida (Fig. 1b), foi sintetizada pela primeira vez em 1953 pela empresa farmacêutica CIBA da Suíça. Contudo, a aparente falta de efeitos farmacológicos levou a empresa a suspender as pesquisas. Os químicos da companhia farmacêutica da República Federal da Alemanha (Ocidental), “Chemie Grünenthal”, Wilhelm Kunz e Herbert Keller sintetizaram-na em 1954 e mantiveram seu desenvolvimento (RANDALL, 1990). Kunz e colaboradores (1956) publicaram o primeiro artigo descrevendo os efeitos farmacológicos da talidomida. A empresa disponibilizou a talidomida sob o nome de *Contergan* como composto de efeito hipnótico, sedativo e tranquilizante. Estudos experimentais mostraram que administrações de 100-500mg/kg de talidomida a camundongos, cobaias e coelhos por 30 dias apresentaram ser bem toleráveis, levando então os pesquisadores da “Chemie Grünenthal” a proporem que a talidomida seria um sedativo-hipnótico benéfico sem apresentar risco de morte por suicídio, ao contrário de alguns medicamentos da época (BOTTING, 2001). Os resultados de testes para verificar a atividade sedativa da talidomida em animais não foram muito promissores. Porém, o perfil sedativo-hipnótico da talidomida foi bem caracterizado em humanos, principalmente para o tratamento de epilepsia como um anticonvulsivante, sendo que essa atividade não foi caracterizada em várias espécies de animais estudadas (KELSEY, 1967). Além disso, possui propriedades que combatem a insônia e atua no tratamento contra enjôos matinais em mulheres grávidas. A talidomida apresentou rápida ação e efeito sedativo mais profundo e de longa duração em comparação com outros fármacos sedativos, como fenobarbital e glutetimida. Além disso, não afetou na capacidade de coordenação em camundongos, mesmo em doses maiores que as correspondentes para efeitos sedativos. Doses da talidomida excedendo 5000mg/kg não foram letais em roedores. Entretanto 600mg/kg de fenobarbital e 300mg/kg de glutetimida, respectivamente,

foram o suficiente para matar metade dos roedores do grupo teste (BOTTING, 2001).

Em 1956, a talidomida alcançou o mercado alemão como um fármaco não-tóxico e sedativo-hipnótico, tornando-se o medicamento mais vendido na Alemanha para o tratamento da insônia (ZWINGENBERGER e WNENDT, 1996). No final de 1950, 14 empresas farmacêuticas comercializavam a talidomida em 46 países, incluindo países da Europa e América do Sul, Canadá e outras regiões. Apesar da ampla comercialização, a talidomida não obteve licença do *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América para o uso neste país, tendo em vista que, segundo os critérios da FDA, seria necessário aprofundar a experimentação devido a ocorrência de neurites periféricas traduzidas por intensas câibras, fraqueza muscular e perda de coordenação motora, reportadas à época em pessoas que fizeram uso da talidomida (KELSEY, 1988).

O composto tornou-se amplamente popular na Alemanha e, em alguns casos, sendo comercializado sem prescrição médica em função da sua aparente margem de segurança. No entanto, em 1958, a empresa alemã começou a receber notificações de neuropatias periféricas (KELSEY, 1967). A correlação entre o seu uso e o aparecimento de focomelia, caracterizada pelo desenvolvimento irregular de braços e/ou de pernas nos filhos de mulheres que tinham usado o composto durante a gravidez, não foi percebida claramente à época (BORGES e FRÖEHLICH, 2003). McBride (1961) e Lenz e colaboradores (1962) descreveram malformações em membros e no intestino de crianças nascidas de mães que usaram a talidomida durante a gestação. O uso da talidomida durante o primeiro trimestre de gestação conduziu a elevadas taxas de focomelia, defeitos nos ossos longos, ausência de orelhas, malformações no palato, anomalias cardíacas e gastrointestinais (MELCHERT e LIST, 2007).

Assim, após três anos de comercialização e após intensa pressão da imprensa, a talidomida foi retirada do mercado em 1961, deixando um trágico saldo de oito mil crianças com mal-formação congênita em 46 países, inclusive no Brasil (BORGES e FRÖEHLICH, 2003). A médica Frances Kelsey, que não aprovou o uso da talidomida no mercado americano, recebeu o título *Presidential Medal of Freedom* e manteve o papel da FDA ativo por décadas como símbolo de vigilância no tratamento envolvendo questões de risco (BREN, 2001).

Depois de 4 anos, em 1965, foi reportado pela primeira vez pelo médico dermatologista Jacob Sheskin os efeitos clínicos da talidomida em pacientes com Eritema Nodoso Leproso (ENL), uma complicação imuno-inflamatória que afeta pacientes com Hanseníase (BOCHUD, *et al.* 2008). Segundo a revisão de LIMA, FRAGA e BARREIRO (2001), o médico dermatologista Jacob Sheskin observou uma redução da dor e dos processos inflamatórios associados ao leproma após o tratamento com talidomida, identificando novas propriedades antiinflamatórias deste fármaco. Esses resultados estimularam novas pesquisas a respeito dos efeitos da talidomida em lepromas e em outras enfermidades relacionadas a processos inflamatórios. Apesar de seus efeitos na redução de febres, suores noturnos, e lesão de pele em pacientes com ENL, somente em 1998 a talidomida recebeu da FDA autorização para seu uso nessa indicação (TEO *et al.*, 2002).

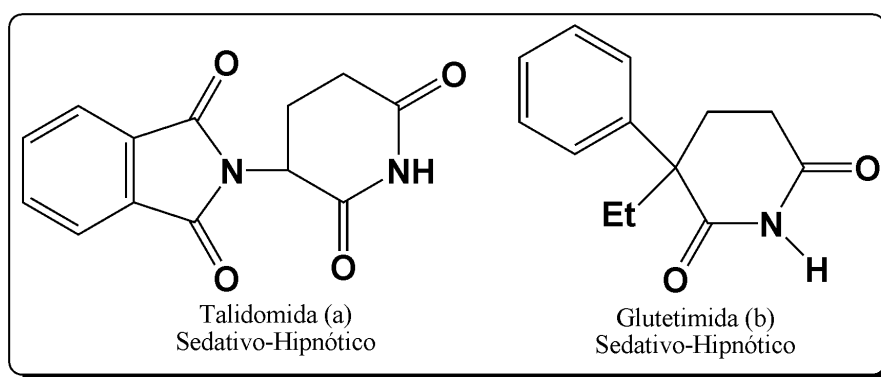


Figura 1 Representação estrutural da talidomida e glutetimida (adaptado de LIMA, FRAGA e BARREIRO, 2001)

## 1. 2. Características químicas e farmacológicas da talidomida

A talidomida contém um grupo glutarimídico com um único centro quiral na posição 3' e um grupamento ftalimida (Fig. 2a) e consiste numa mistura racêmica com dois enantiômeros ativos, S(-) e R(+) (Fig. 2b).

Acreditava-se que a isoforma S(-) correspondesse ao enantiômero relacionado aos efeitos teratogênicos e que o enantiômero R(+) fosse relacionado aos efeitos sedativos. Com isso, procedimentos executados para a purificação da isoforma R(+), visando-se otimizar sua aplicação clínica, resultaram numa rápida interconversão dos isômeros em condições fisiológicas. Ou seja, a aplicação do enantiômero puro resulta em embriopatia. Além disso, estudos demonstraram que as

duas formas foram teratogênicas em modelos utilizando-se coelhos da linhagem Nova Zelândia Branco, que são susceptíveis aos efeitos teratogênicos da talidomida. Logo, foi evidenciado que a relação entre a estereoespecificidade e o efeito teratogênico é dependente do modelo animal (ERIKSSON, BJORKMAN e HOGLUND, 2000; FABRO, SMITH e WILLIAMS, 1967). Por outro lado, segundo Teo e colaboradores (2004), o enantiômero (S-) é responsável pela atividade anti-fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  enquanto que o (R+) é responsável pelo efeito sedativo mediado por receptores de sono. Conforme enunciado por Wnendt e Zwingenberger (1997), a falta de separação entre estereoespecificidade relacionada a atividade sedativa e inibitória em relação a teratogenicidade e também a rápida racemização da talidomida contradizem a hipótese de que o uso do enantiômero puro preveniria o efeito trágico da talidomida.

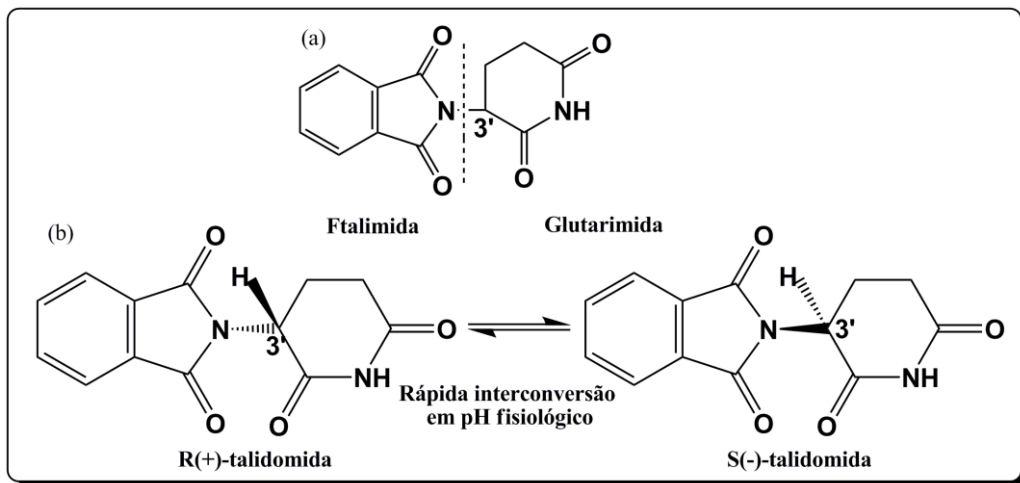


Figura 2 Representação estrutural dos grupamentos da talidomida (a) e dos seus enantiômeros (b) (adaptado de FRANKS, MACPHERSON e FIGG, 2004).

A baixa solubilidade em água apresentada pela talidomida resulta na sua administração via oral, cujo pico da concentração plasmática detectável em 3-6 horas é dependente da dose. Uma vez ingerida, a talidomida é clivada por hidrólise não-enzimática em mais de 12 a 20 diferentes tipos de metabólitos, sendo pouco metabolizada no fígado (SCHUMCHER *et al.*, 1965). Segundo a revisão de Lima, Fraga e Barreiro (2001), mais de 90% do fármaco absorvido é eliminado através das fezes e urina com 48 horas e estudos sobre o destino metabólico da talidomida, evidenciaram que a droga apresenta instabilidade em solução aquosa, onde em pH ácido (pH=6,0) observou-se hidrólise espontânea do anel glutarimídico (Fig. 3a e

3b). Contudo, em pH fisiológico (7,4) (Fig. 3c e 3d) a talidomida sofre metabolismo de 28% na primeira hora de ensaio, sendo os metabólitos identificados como produtos de hidrólise do anel ftalimídico e glutarimídico. Por outro lado, em pH=8,0 sua taxa de metabolização é consideravelmente aumentada (66% na primeira hora) evidenciando que o metabolismo *in vivo* da talidomida é estritamente relacionado ao pH do sistema.

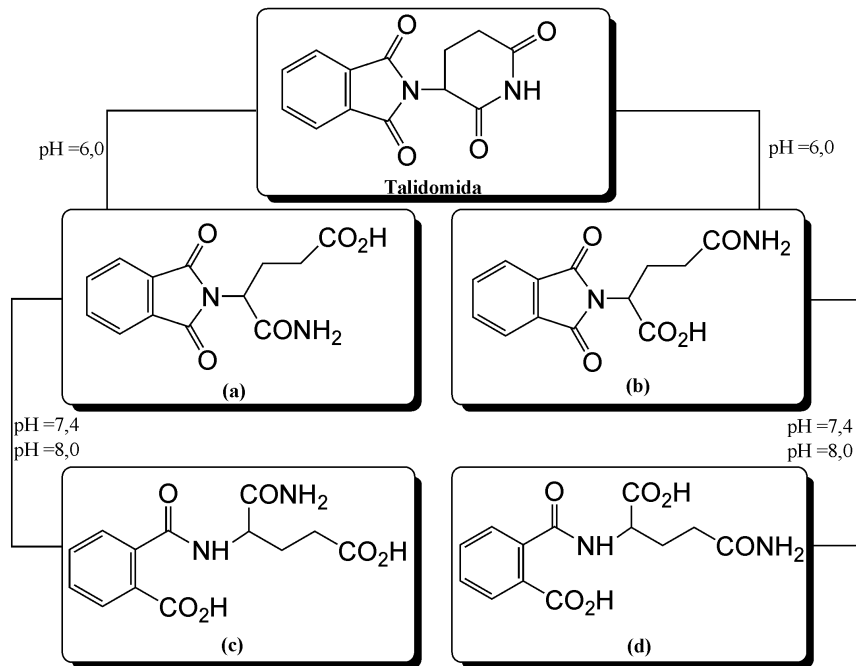


Figura 3 Principais metabólitos *in vivo* da talidomida (adaptado de LIMA, FRAGA e BARREIRO, 2001).

### 1. 3. Efeitos da talidomida na produção de citocinas

Estudos mostram que a talidomida possui capacidade de influenciar tanto em aspectos da imunidade inata quanto adquirida, reforçando o amplo espectro de atuação desta substância (PARAVAR e LEE, 2008).

Um mecanismo importante no qual a imunidade inata exerce seu papel imunorregulatório é através da produção de citocinas e quimiocinas. Citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  podem apresentar importante papel na patogênia de diversas desordens imunológicas.

A citocina TNF- $\alpha$  apresenta uma atividade multifuncional, desempenhando papel na apoptose e sobrevivência das células, bem como resposta inflamatória e

imune (HORSSSEN *et al.*, 2006). Sampaio e colaboradores (1991) demonstraram em trabalhos pioneiros que pacientes com Hanseníase apresentavam níveis elevados da substância moduladora TNF- $\alpha$  e que a talidomida demonstrou capacidade de inibir a produção desta citocina por monócitos. A identificação de umas das formas de atuação da talidomida no sucesso do tratamento do ENL levou ao renascimento do interesse sobre a talidomida e estimulou o estudo de seus análogos (SAMPAIO *et al.*, 2006). Tavares e colaboradores (1997) demonstraram também este efeito em macrófagos alveolares humanos de pacientes com tuberculose, estimulados *in vitro* com lipopolissacarídeo (LPS). Em contrapartida, a talidomida não apresentou efeito inibitório quanto a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos alveolares bovino estimulados com LPS de *Mannheimia haemolytica* e leucotoxina (MALAZDREWICH *et al.*, 2004), e em células T humanas a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimuladas com anticorpos anti-CD3 (CORRAL *et al.*, 1999). Portanto, apesar de sua capacidade geral em inibir a produção de TNF- $\alpha$  conforme estudos *in vitro*, o efeito inibitório é dependente do estímulo e da célula utilizada.

Pacientes com ENL, onde os níveis da citocina TNF- $\alpha$  estão elevados no plasma bem como há grande liberação de TNF- $\alpha$  por parte de monócitos, a talidomida não somente melhorou as manifestações clínicas como também reduziu os níveis séricos de TNF- $\alpha$  (SAMPAIO *et al.*, 1992; SAMPAIO *et al.*, 1993). Barnhill e colaboradores (1984) mostraram que a talidomida possui a capacidade de inibir a atividade fagocitária de neutrófilos e monócitos, sem causar efeito citotóxico. Este processo poderia contribuir para explicar a forma de atuação da talidomida em processos inflamatórios que culminam com acúmulo de células mononucleares. As células fagocíticas utilizam enzimas lisossomais, ativação do *burst* respiratório, processo que envolve produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, e a produção de óxido nítrico (NO) para combater os patógenos. Nielsen e Valerius (1986) demonstraram que a talidomida aumenta a liberação de ânion superóxido por neutrófilos. Contudo, outro estudo mostrou que a talidomida não apresenta efeito no *burst* respiratório de neutrófilos (DUNZENDORFER *et al.*, 1997).

Pacientes com tuberculose tratados com talidomida apresentaram níveis reduzidos de TNF- $\alpha$  tanto *in vitro* quanto *in vivo* bem como ganho de peso (TRAMONTANA *et al.* 1995). O mesmo efeito foi observado em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV)-1 tratados com talidomida mostrando



significante queda de TNF- $\alpha$  e dos níveis da carga viral, com ganho de peso significativo em pacientes com tuberculose HIV-1 positivos (KLAUSNER *et al.* 1996).

A interleucina (IL)-6 é uma importante citocina envolvida na interação e proliferação de células do mieloma múltiplo (MM) e células endoteliais da medula óssea (CALIGARIS-CAPPIO *et al.*, 1991). Camundongos infectados com a linhagem Erdman de *Mycobacterium tuberculosis* tiveram redução dos níveis de IL-6 no soro quando tratados com talidomida (MOREIRA *et al.*, 1997). Em estudos *in vitro*, Rowland e colaboradores (1998) mostraram redução dos níveis de mRNA de IL-6 de PBMC humano estimuladas com mitógeno fitohemaglutinina (PHA). O mesmo efeito de redução da produção de IL-6 foi observado em células do estroma da medula óssea, células de MM e seus co-cultivos (GUPTA *et al.* 2001).

A IL-1, outra importante mediadora da resposta imune inata e da resposta imune de fase aguda, tem recebido destaque quanto a atividade inibitória da talidomida. Em modelo de injúria por queimadura em roedores (ESKI *et al.*, 2008) e pancreatite induzida por ceruleína (decapeptídeo isolado da pele de anfíbio usado para estimular secreções gástrica, biliar e pancreática) (MALLEO, *et al.* 2007), a talidomida reduziu os níveis de IL-1 e IL-1 $\beta$  no plasma, respectivamente, sugerindo-se desta forma a IL-1 como potencial alvo da talidomida.

Moller e colaboradores (1997) demonstraram que a talidomida possui efeitos inibitórios quanto a produção de IL-12 por células mononucleares do sangue estimuladas com LPS ou *Staphylococcus aureus* Cowan (SAC). Os autores recomendaram cautela no tratamento com a talidomida de pacientes com HIV, uma vez que, conforme demonstrado por Chehimi e colaboradores (1994), o PBMC desses pacientes possuem baixa produção desta citocina. A IL-12 é crucial no desenvolvimento da resposta imune celular responsável por estimular a produção de IFN- $\gamma$  e o aumento da atividade citotóxica de LT CD8+ e células NK no combate a infecções causadas por vírus (TRINCHIERI e SCOTT, 1995). Utilizando ratos Wistar tratados com ácido sulfônico 2,4,6 trinitribenzeno, usado para indução de colites de Crohn's, observou-se redução dos níveis de IL-12 em culturas de células de amostras do cólon no grupo tratado com talidomida (CARVALHO *et al.*, 2007). O mesmo efeito inibitório foi observado em PBMC e em células da lâmina própria obtidas através de biópsias de pacientes com doença de Cronh's (BAUDITZ *et al.*, 2002). Em contraste, Haslett e colaboradores (1999), demonstraram em PBMC

estimuladas com anticorpos anti-CD3 o aumento de IL-12 e IFN- $\gamma$  em resposta ao tratamento com talidomida. Outros estudos *in vivo* mostraram que em pacientes com ENL houve aumento da produção de IL-12 após tratamento com talidomida (HASLETT *et al.*, 2005), o mesmo observado em pacientes com HIV (HASLETT *et al.*, 1999). Portanto, a literatura descreve efeitos inibitórios e estimulatórios do tratamento com talidomida sobre a produção de IL-12, o que sugere a necessidade de novas investigações.

#### **1. 4. Efeitos da talidomida na produção de NO**

Pequenos mediadores de processos inflamatórios como o NO são produzidos por macrófagos estimulados, sendo reconhecidamente importantes nos processos inflamatórios (PACHER, BECKMAN, e LIAUDET, 2007). Fortes evidências sugerem o envolvimento do NO em vários processos fisiopatológico, incluindo inflamação e choque séptico (WEINSTEIN, GOLD e DEFRANCO, 1991). A regulação da produção de NO é feita pela NO sintase (NOS) e três isoformas são conhecidas: a neural (nNOS ou NOS I), a endotelial (eNOS ou NOS III), sendo essas duas produzidas de forma constitutiva e cuja atividade enzimática é regulada pela concentração de cálcio intracelular; e a terceira compreende na NOS induzida (iNOS ou NOS II), sendo produzida em grande quantidade quando na presença de sinais oriundos dos estímulos por LPS, interferon (IFN)- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 (DUDZINSKI *et al.*, 2006). Shimazawa e colaboradores (2004) demonstraram pela primeira vez o papel da talidomida na inibição da atividade da iNOS, embora apresentando baixa atividade.

#### **1. 5. Efeitos da talidomida na produção de quimiocinas**

A migração de leucócitos e a quimiotaxia são eventos induzidos por diversas quimiocinas, dentre elas a CXCL8, descrita inicialmente como IL-8, liberada por macrófagos teciduais e queratinócitos em resposta a patógenos (PARAVAR e LEE, 2008). A migração de células T para o local de inflamação como, por exemplo, intestino, mucosa e alvéolos, ocorre em resposta a moléculas quimioatraentes,

incluindo proteína quimioatraente de monócitos CCL2, descrita pela primeira vez como MCP-1, a CCL5 (*regulated on activation normal T cell expressed and secreted*), e a proteína induzida por interferon-gama CXCL10, descrita inicialmente como IP-10 (AGOSTINI *et al.*, 2002; PETREK *et al.*, 2002;).

A migração e acúmulo de linfócitos T (LT) do perfil T helper 1 (Th)1, expressando receptores específicos CXCR3 para quimiocinas deste perfil, são favorecidos pela produção de quimiocina CXCL10 por macrófagos e a produção de monocina induzida pelo interferon-gama CXCL9 (AGOSTINO *et al.*, 1998). Este acúmulo de LT contribui para enfermidade conforme descrito em trabalhos de Wenzel e colaboradores (2007), onde biópsia de pacientes com diferentes subtipos de lupus eritematoso (LE) revelou uma associação morfológica entre acúmulo de células Th1 CXCR3+ e presença de quimiocinas induzidas por IFN- $\gamma$ . Além disto, o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  atuam em sinergismo para produção de CCL5 por células endoteliais (MARFAING-KOKA *et al.*, 1995), atuando como fator quimiotático para células T de memória, monócitos/macrófagos, basófilos e eosinófilos (BEN-BARUCH, MICHIEL e OPPENHEIM, 1995; SCHALL *et al.*, 1990).

Estudos *in vitro* mostraram que a talidomida induz inibição da L-selectina, molécula envolvida no rolamento dos leucócitos no endotélio para posterior transmigração e direcionamento ao tecido, em linfócitos e granulócitos (GEITZ, HANDT e ZWINGENBERGER, 1996). Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVEC) estimuladas com TNF- $\alpha$  apresentaram redução da expressão de E-selectina, sugerindo-se um efeito regulatório no rolamento de leucócitos. Dunzendorfer e colaboradores (1999), utilizando-se do mesmo modelo com células HUVEC, mostraram que a talidomida influencia na capacidade de produção e liberação de CXCL8, não sendo somente um efeito relacionado a diminuição da expressão de moléculas de adesão, conforme o trabalho anterior.

Ye e colaboradores (2006) avaliaram o efeito *in vitro* da talidomida em macrófagos do lavado bronco alveolar (BALF) de pacientes com doenças intersticiais pulmonares, como sarcoidose, fibrose pulmonar idiopática e pneumonites de hipersensibilidade, mostrando redução na produção de TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e CXCL8. Em trabalho com células de micróglia humana estimuladas com LPS, Lokensgard e colaboradores (2000) mostraram que a talidomida consegue inibir a produção de

CXCL8 dose-dependente e que contribuiu também para reduzir a transcrição do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) para CXCL8. Contudo, seu efeito inibitório não foi observado para as quimiocinas CCL2 e CCL5.

### **1.6. Efeito da talidomida na ativação de células T**

Outro efeito exercido pela talidomida reside no seu potencial para co-estimular células T humanas. A resposta imune a antígenos externos é um processo altamente regulado que requer a apresentação de peptídeos ligados ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) por células apresentadoras de antígeno (APC).

As principais células APC são células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, as quais expressam além de moléculas do MHC-1, moléculas do MHC-2 envolvidas na apresentação de antígenos exógenos. Além de reconhecimento do antígeno associado ao MHC por receptores dos linfócitos T (TCR), moléculas acessórias como CD80 e CD86 presentes em APC, interagem com moléculas CD28 presente na superfície de LT, promovendo sinal secundário para promover ativação de LT. O sinal primário oriundo da apresentação do peptídeo via MHC-APC para o complexo TCR-LT pode ser mimetizado por ligação cruzada entre o complexo TCR de células T com anticorpo anti-CD3, uma molécula do TCR responsável pela transdução de sinais via domínio citoplasmático, obtidos pela ligação do complexo peptído-MHC ao TCR. O sinal secundário é independente do antígeno e pode ser promovido por citocinas ou por ligantes na superfície das células APC que interagem com receptores nos LT. Essas interações direcionam a ativação de células T mediado pela IL-2 seguida de produção de citocinas, proliferação celular de linfócitos e ativação de mecanismos efetores da resposta imune (JANEWAY *et al.*, 2007).

Foi descrito que a talidomida é capaz de aumentar a resposta mediada por LT CD8+ na ausência de sinal secundário mediado por moléculas co-estimulatórias (HASLETT *et al* 1998). Verbon e colaboradores (2000) mostraram um efeito positivo da talidomida *in vitro*. Esses autores observaram que em PBMC de indivíduos saudáveis que receberam doses orais de talidomida, após 24 de incubação com enterotoxina estafilococcia B ou anti-CD3, ocorreu um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e IL-12. Experimentos *in vitro* utilizando células T sugerem que a talidomida aumenta a produção de IL-2 via co-estimulação e que este efeito resulta na proliferação de células T e produção de IFN- $\gamma$  (MELCHERT e LIST, 2007). A

capacidade da talidomida em permitir ativação de células T na ausência de co-estimulação é difícil de interpretar no contexto de sua habilidade de tratar doenças inflamatórias, contudo, seu potencial em ativar resposta mediada por células T aumentando a resposta imune contra tumores pode ser um mecanismo com o qual a talidomida é efetiva no tratamento de tumores (PARAVAR e LEE, 2008).

Foi sugerido que a talidomida afeta no balanço entre a resposta do tipo Th-1 e Th-2 devido a modulação de citocinas como IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  (MCHUGH *et al.*, 1995). Esses autores mostraram que o tratamento com talidomida em PBMC humano estimuladas com PHA ou com estreptocinase: estreptodornase (SKSD), uma mistura das proteínas estreptocinase e estreptodornase produzidas por estreptococos hemolíticos, resultou em aumento da resposta Th2 com aumento da produção de IL-4.

Haslett e colaboradores (2003) demonstraram o efeito da talidomida no aumento da produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-2 e da atividade citotóxica de LT CD8+ específicos contra o vírus HIV. Outra evidência de que a talidomida influencia na ativação de células T foi demonstrada por Shannon e colaboradores (1992), mostrando que pacientes com lepra lepromatosa tratados com talidomida apresentaram uma redução de LT CD4+ no sangue periférico.

Estudos com análogos da talidomida, como o análogo 4-amino substituído CC-4047, mostraram o seu potencial para tratamento de doenças alérgicas e certos tipos de linfomas dependentes de resposta Th2, visto que este composto foi capaz de atuar na ativação e diferenciação de células T a nível molecular, aumentando a expressão do fator de transcrição T-bet em LT CD4+ naive e Th2 pré-polarizadas. Esta modulação resultou em aumento da diferenciação de células T naive em Th1 e produção de citocinas deste perfil (XU, *et al.*, 2008).

Esses trabalhos indicam que os efeitos imunomodulatórios da talidomida são variáveis e dependem do tipo celular ativado e do tipo de estímulo que a célula recebe.

### **1.7. Efeito da talidomida na angiogênese**

De acordo com Folkman (1971), a angiogênese é vital no crescimento e metástase de tumores. Tem sido demonstrado que a talidomida apresenta atividade

antiangiogênica, reforçando seu papel no combate a patologias dependentes de angiogênese, como na formação de tumores sólidos (BAUER, DIXON e FIGG., 1998).

No início de 1990, a talidomida foi reportada por exibir potencial propriedade antiangiogênica, sendo um dos possíveis mecanismos relacionados para contribuir com os efeitos teratogênicos observados em crianças de mulheres que fizeram uso da talidomida durante a gravidez. Estudos de D'Amato e colaboradores (1994), mostraram que os efeitos malignos da talidomida relacionados a teratogênese residem no fato de sua capacidade de interferir na formação de vasos. Utilizando-se de um modelo de córnea de coelhos, cuja formação de vasos é influenciada por uma proteína angiogênica, fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), foi demonstrado que a talidomida inibe a angiogênese. Essa descoberta levou a novas especulações a respeito do papel da talidomida em patologias envolvendo a dependência de formação de novos vasos para o tratamento de doenças malignas. O primeiro tipo de tumor no qual a talidomida foi utilizada consistiu no tratamento do MM refratário, onde uma proeminente vascularização ocorre na medula óssea de pacientes com essa enfermidade (SINGHAL *et al.*, 1999).

Esses resultados encorajaram outras pesquisas para avaliar o papel da talidomida no tratamento de outros tipos de tumores. Simultaneamente, investigações para o desenvolvimento de análogos que aumentem essa atividade com um perfil toxicológico mais aceitável tem sido de grande interesse (SLEIJFER, KRUIT e STOTER, 2004). Desde então, outros mecanismos relacionados a ação da talidomida como fármaco anti-neoplásico foram revelados. Conforme demonstrado por D'Amato e colaboradores (1994) e Sampaio e colaboradores (1991), a talidomida exerce seu efeito antiangiogênico através da redução da produção de TNF- $\alpha$ , diminuição do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), diminuição do bFGF, redução da produção da integrina  $\alpha V\beta 3$ , e diminuição de moléculas de adesão em células endoteliais. Outros estudos *in vitro* reforçaram o papel chave da talidomida como droga antiangiogênica (KOMOROWSKI *et al.*, 2006; VASVARI *et al.*, 2007).

Pode-se presumir que atividade antiangiogênica da talidomida seja importante na atividade anti-neoplásica (KENYON, BROWNE e D'AMATO, 1997) e tem respaldo no fato de que VEGF, bFGF e TNF- $\alpha$  estarem elevados em neoplasias hematológicas (BELLAMY *et al.*, 1999). A interação entre células do MM e células do

estroma da medula óssea (BMSC) modula a secreção de VEGF e aumenta o crescimento de células MM e angiogênese (ZHANG *et al.*, 2005). Trabalhos de Vacca e colaboradores (2005) sugerem que a talidomida exerça seu efeito antiangiogênico em células de pacientes com MM inibindo a expressão de VEGF e  $\beta$ FGF. Contudo, o efeito da talidomida no tratamento do câncer relaciona-se não somente na inibição do efeito angiogênico, mas também em outros mecanismos incluindo efeito direto anti-neoplásica e antiproliferativo (ARRIETA *et al.*, 2002).

Em maio de 2006, a talidomida foi aprovada pela US FDA para o tratamento do MM em conjunto com dexametasona (MELCHERT e LIST, 2007) – um glucocorticóide sintético utilizado no tratamento de diversas doenças inflamatórias, como artrite reumatóide e LE (MIKAMI *et al.*, 2007).

## **1. 8. Mecanismo de ação da talidomida na inibição da resposta imune**

Após ter sido relatado o efeito da talidomida na inibição da produção de TNF- $\alpha$ , novos estudos demonstraram as possíveis vias de atuação da talidomida no sistema imune, através de mecanismos como: diminuição da meia-vida do mRNA para TNF- $\alpha$ , inibição da ativação do fator- $\kappa$ B nuclear (NF- $\kappa$ B), inibição da produção da alfa 1-glicoproteína ácida (AGP), indução de apoptose, inibição da produção de fosfodiesterase (PDE)-4 e influência na expressão gênica.

### **1. 8. 1. Ação da talidomida na ativação do NF- $\kappa$ B**

O fator ativador da transcrição de genes codificando citocinas, NF- $\kappa$ B, é um regulador chave das funções imunes e inflamatórias (KEIFER *et al.*, 2001), envolvido também na transcrição de quimiocinas, ligantes de superfície como B7 e moléculas de adesão a superfície.

Uma série de efeitos exercidos pela talidomida em vários tipos de atividades biológicas podem ser explicados por seu efeito na atividade do NF $\kappa$ B. Esse fator transcricional está envolvido em vários processos fisiológicos, incluindo a regulação de genes relacionados a inflamação como, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e COX-2, proteínas

envolvidas na apoptose (proteína 2 inibidora de apoptose ou c-IAP2 e caspase-8) e fatores angiogênicos (como VEGF, TNF- $\alpha$  e CXCL8) (HAYDEN e GHOSH, 2004; JIN *et al.*, 2007).

A inibição provocada pela talidomida na atividade de NF- $\kappa$ B em células T Jukart estimuladas com TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ocorre através da supressão da atividade da quinase I $\kappa$ B, formada pelos complexos IKK1/ $\alpha$ , IKK2/ $\beta$  e IKK $\gamma$  ou NEMO. A I $\kappa$ B é responsável por fosforilar o inibidor da ativação do NF- $\kappa$ B, o I $\kappa$ B $\alpha$  (LOKENS GARD, *et al.*, 2000; KEIFER *et al.*, 2001). Uma vez que o inibidor é fosforilado, o NF- $\kappa$ B é translocado ao núcleo ligando-se a sequências específicas dos genes-alvo para a transcrição. Contudo, conforme demonstrado por Majumdar e colaboradores (2002) em linhagem de células T Jukart, a talidomida não teve efeito na ativação de NF- $\kappa$ B em resposta a ceramídeos, LPS, ou forbol éster, sugerindo-se que a habilidade da talidomida em modular a expressão gênica via ativação de NF- $\kappa$ B depende do mecanismo de sinalização ativado por indutores específicos (SAMPAIO *et al.*, 2006).

Em geral, estes estudos sugerem que a talidomida possui um efeito inibitório no NF- $\kappa$ B. Embora muitos estudos sugerem este efeito, trabalhos futuros são necessários com células T primárias humanas ao invés de células da linhagem Jurkat para confirmar a relevância do NF- $\kappa$ B como alvo potencial da talidomida (PARAVAR e LEE, 2008).

### **1. 8. 2. Ação da talidomida sobre o RNA mensageiro**

Foi proposto que um mecanismo pelo qual a talidomida inibe a produção de TNF- $\alpha$  é acelerando a degradação de mRNA para TNF- $\alpha$  em PBMC humano estimuladas com LPS, onde observou-se uma redução da meia vida do mRNA de 30 minutos para 17 minutos (MOREIRA *et al.*, 1993). Além disso, outros trabalhos mostraram que a talidomida influencia na estabilidade do mRNA para outras substâncias como as envolvidas na angiogênese. Mudanças no fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular são eventos parcialmente mediados por prostaglandinas (PGE), como a PGE<sub>2</sub>, que é vasodilatadora e sua liberação resulta em dor e febre, sinais sistêmicos da resposta inflamatória. A enzima cicloxigenase (COX) catalisa a produção de prostaglandina, sendo conhecidas duas isoformas desta enzima: COX-



1 expressa constitutivamente e a COX-2 que é induzida em certos tipos de resposta inflamatória. Noguchi e colaboradores (2002) mostraram que a talidomida possui atividade inibitória sobre COX-1/COX-2 que apesar de ter sido menor que a aspirina, pode contribuir para seu efeito farmacológico nas propriedades anti-inflamatórias e anti-neoplásicos.

Em estudos com PBMC humano estimuladas com LPS, Payvandi e colaboradores (2004) mostraram que PBMC tratadas com talidomida exibiram uma inibição da expressão de mRNA para COX-2 levando a inibição de secreção de PGE<sub>2</sub>. A inibição de COX-2 tem sido demonstrada como sendo através da desestabilização de mRNA para COX-2 (FUJITA *et al.*, 2001), através de inibição do deslocamento citoplasmático de antígeno humano R (HuR), que é um estabilizador de proteínas, e inibição da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK) p38, que está envolvida na regulação pós-transcricional da estabilidade do mRNA COX-2 (JIN *et al.*, 2007). Estes efeitos podem contribuir para a atividade antiangiogênico da talidomida, visto que COX-2 é altamente expressa em vários tipos de câncer (LADETTO *et al.*, 2005).

### **1. 8. 3. Ação da talidomida sobre a produção de alfa 1-glicoproteína ácida**

A glicoproteína humana AGP é uma proteína de fase aguda sintetizada por hepatócitos em resposta a variados tipos de estresses (FOURNIER, MEDJOUBI-N e PORQUET, 2000). Sua produção por células hepáticas é regulada pelas citocinas IL-1 e IL-6, mas também por CXCL8, TNF- $\alpha$  e hormônios esteroidais (SETA *et al.* 1991; AZUMA, MURATA e MATSUMOTO, 2000). Foi demonstrado que a talidomida é capaz de se ligar a AGP e de inibir sua atividade de potencializar a produção de TNF- $\alpha$ ; contudo, o papel fisiológico da AGP na regulação *in vivo* de TNF- $\alpha$  ainda não esteja clara (TURK, JIANG e LIU, 1996).

### **1. 8. 4. Ação da talidomida sobre a produção de PDE-4**

A PDE-4 compreende a um grupo de enzimas integrante da superfamília da fosfodiesterase (PDE) que agrupa 11 membros cuja atividade enzimática

corresponde a hidrólise de importantes mensageiros secundários intracelulares, como o AMPc (3', 5'-adenosina monofosfato cíclica) e o GMPc (3', 5'- guanosina monofosfato cíclica) (SOUNESS, ALDOUS e SARGENT, 2000; GIEMBYCZ, 2002). Conforme observado por Moore e Willoughby (1995), o aumento dos níveis intracelulares de AMPc resulta em controle da resposta imune inflamatória *in vivo* e inibição de vários processos celulares *in vitro*, como por exemplo a liberação de citocinas e NO por macrófagos, indicando que o AMPc possui um importante papel na modulação das respostas inflamatórias (LAWRENCE, WILLOUGHBY e GILROY, 2002).

Verghese e colaboradores (1995) demonstraram em PBMC ativadas que os níveis elevados de AMPc corresponderam com a inibição da produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Muller e colaboradores (1998) observaram que a talidomida apresentou baixo efeito sobre a inibição da produção de PDE-4, ao contrário do apresentado por análogos da talidomida da classe de ácidos *N*-ftaloil-3-amino-3-irilpropiónico. Esses análogos foram descritos previamente por esses autores como sendo fortes inibidores da produção de TNF- $\alpha$ , associando, desta forma, a inibição da produção de TNF- $\alpha$  com a inibição da produção de PDE-4.

### **1. 8. 5. Ação da talidomida induzindo a apoptose**

A expansão clonal e crescimento de tumores são eventos parcialmente mediados por falhas no mecanismo de apoptose (PARAVAR e LEE, 2008). Em células de MM humano, a talidomida inibe o crescimento celular e induz apoptose (HIDESHIMA *et al.*, 2000), diminuindo a expressão da proteína supressora de apoptose Bcl-2 no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com MM (DMOSZYNSKA *et al.*, 2005).

Gockel e colaboradores (2004) mostraram que PBMC de pacientes tratados com talidomida resultou na apoptose de monócitos envolvendo citocromo c dependente, ativando procaspase-9 e caspase-3 efetora, promovendo a manifestação dos sinais clássicos de apoptose. Outros efeitos foram observados em vários níveis de receptores associados a morte, incluindo aumento da atividade do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), aumento da sensibilidade

do indutor de apoptose faz e aumento da expressão de caspase 8 (KEIFER *et al*, 2001; MITSIADES *et al*, 2002). Em parte, esse mecanismo pode explicar os efeitos regulatórios observados dos variados mediadores inflamatórios derivados de monócitos e as propriedades imunomodulatórias observadas da talidomida que contribuem para seu efeito benéfico em várias desordens imunológicas (GOCKEL *et al.*, 2004).

#### **1. 8. 6. Ação da talidomida na expressão gênica**

Em função da capacidade de se ligar ao DNA (SCHUMACHER *et al.*, 1968), foi proposto que a talidomida possui capacidade de influenciar na produção de citocinas interferindo com o DNA. Segundo Sampaio e colaboradores (2006), uma especulação a respeito do mecanismo de ação da talidomida reside na sua estrutura, que é complementar às bases do DNA, como adenina (Fig. 4d) e guanina (Fig. 4b). Em solução, a talidomida se liga mais avidamente a guanina do que a adenina, e apresenta pouca afinidade para citosina (Fig. 4c) e timina (Fig. 4a). Com isso, segundo Sampaio e colaboradores (2006), a talidomida pode exercer seu efeito desligando os genes envolvidos com resposta inflamatória através da capacidade de se intercalar a regiões promotoras, bloqueando o acesso de proteínas envolvidas com a transcrição a essa região.

Drucker e colaboradores (2003) mostraram em células de linhagem de mieloma a inibição transcricional de genes com regiões promotoras ricas em GC, como o gene transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT), um componente catalítico da telomerase. Os autores mostraram que a talidomida intercalou-se na região promotora do gene hTERT, o qual serve de ligação para o fator SP-1 envolvido na transcrição gênica. O gene hTERT se encontra elevado em células progenitoras e também é bem caracterizado no fenótipo de células tumorais (NILSSON *et al.*, 1994). Além disso, a expressão do gene hTERT é um importante passo para transformação de células malignas (HAHN *et al.*, 1999). Logo, atenuar a expressão da telomerase pode não apenas contribuir para diminuir o crescimento de células tumorais como atuar seletivamente sobre células transformadas ao invés de células normais (DRUCKER *et al*, 2003).

Além disso, as seqüências consenso do NF $\kappa$ B são ricas em regiões GC e, segundo Sampaio e colaboradores (2006), a inibição da translocação (conforme mencionado anteriormente) ou a inibição da ligação do NF $\kappa$ B ao DNA compreendam apenas uma parte dos reais efeitos da talidomida na expressão gênica.

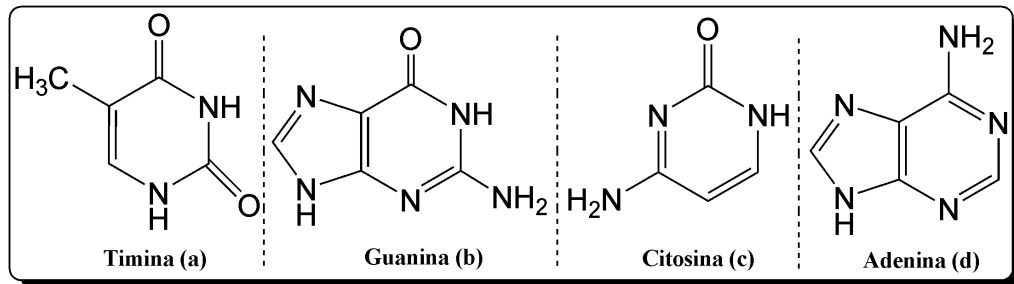


Figura 4 Representação estruturas das bases nitrogenadas do DNA.

### 1.9. Perspectiva dos estudos com a talidomida

Recentemente, a talidomida vem atraindo atenção para outras desordens devido aos seus efeitos, como doença de Behçet, doença do enxerto-versus-hospedeiro, efeitos potenciais na síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS), MM, desordens dependentes de angiogênese, câncer de próstata, artrite reumatóide, carcinoma renal, câncer hematológico (PEARSON e VEDAGIRI, 1969; PARKER *et al.*, 1995; JACOBSON *et al.*, 1997; HAMURYUDAN *et al.*, 1998; KUMAR, *et al.*, 2004; FRANKS, MACPHERSON E FIGG, 2004).

Objetivando-se aprimorar as propriedades farmacocinéticas da talidomida e reduzir seus efeitos teratogênicos, inúmeros esforços de pesquisa têm sido realizados na busca de análogos otimizados, com melhor perfil farmacoterapêutico, na tentativa de manter o grupo funcional responsável pela atividade farmacológica da talidomida (MARRIOT *et al.*, 1998; CORRAL *et al.*, 1999). Os primeiros estudos com análogos buscaram a relação entre a estrutura química e atividade, visando identificar os possíveis grupos com atividade farmacológica. Com isso, foram realizadas modificações estruturais nos grupos glutarimídicos e ftalimídicos da talidomida (LIMA, FRAGA e BARREIRO 2001).

Miyachi e colaboradores (1997) demonstraram que modificações na subunidade ftalimídica são acompanhadas por decréscimo de atividade

farmacológica, sendo o mesmo reforçado por Muller e colaboradores (1999), sugerindo-se então que a estrutura ftalimídica apresenta importante papel na atividade inibitória da produção de TNF- $\alpha$  pela talidomida (LIMA, FRAGA e BARREIRO 2001).

Fármacos imunomodulatórios (immunomodulatory drugs ou IMiD) constituem uma série de compostos que foram desenvolvidos a partir da primeira geração de drogas imunomodulatórias, como a talidomida. A estrutura da talidomida foi utilizada como modelo para químicos na tentativa de sintetizar compostos com elevada atividade imunomodulatória e anti-neoplásica, mas sem apresentar toxicidade (MARRIOTT *et al.*, 2001). Estudos objetivando o desenvolvimento de análogos com elevada atividade anti-TNF- $\alpha$  foram conduzidos, resultando em IMiDs de segunda geração obtidos por Muller e colaboradores (1996) e Marriott e colaboradores (1998). Em trabalhos com análogos, Muller e colaboradores (1996) observaram que compostos apresentando grupo ftalimídico intacto e realizando modificações no grupo glutarimídico hidrolisado, os compostos resultantes derivados de ácidos  $\beta$ -amino  $\beta$ -arilpropiónico foram melhores que a talidomida na inibição da produção de TNF- $\alpha$  em culturas de PBMC humano. Corral e colaboradores (1996) também mostraram que análogos com grupo ftalimido intacto e substituindo-se o anel glutarimídico por grupo fenil contendo radicais metoxi resultou numa melhora significativa da atividade inibitória da produção de TNF- $\alpha$  em PBMC humano. Contudo, Muller e colaboradores (1999) demonstraram que compostos com grupo amino na posição 4 da subunidade ftalimídica apresentaram ser mais potentes que a talidomida na inibição da produção de TNF- $\alpha$  por células do PBMC humano *in vitro*. Dentre os compostos 4-amino substituídos, os análogos CC-5013 (lenalidomida) e CC-4047 (Actimid) foram cerca de 50.000 vezes mais potente que a talidomida na inibição de TNF- $\alpha$  *in vitro* (BARTLETT *et al.*, 2004). Além disto, o composto CC-4047 é um potente co-estimulador de células T, embora apresente atividades antiangiogênicas similares a talidomida (BARTLETT *et al.*, 2004). Em contraste com a talidomida, onde sonolência, constipação e neuropatias periféricas são comuns, dependendo da dose, ambos os fármacos CC-5013 e CC-4047 não apresentam toxicidade neurosedativa (MELCHERT *et al.*, 2007). Contudo, em estudos reportados por Schey e colaboradores (2004), observou-se que em pacientes com MM tratados com o composto CC-4047 foram relatados efeitos colaterais

semelhantes a talidomida, como constipação, neuropatias e trombose venosa profunda, causada pela formação de coágulos (trombos) no interior das veias profundas dos membros superiores e inferiores. Além disso, conforme apontado na revisão de Richardson e Anderson (2004), o composto CC-4047 deve ser usado com cautela devido a possíveis efeitos teratogênicos. Moehler e colaboradores (2006) discutem também que ambos os compostos CC-5013 e CC-4047 apresentam efeito teratogênico e devem ser utilizados com cautela. Outro trabalho avaliando a atividade de análogos N-fenil-ftalimido, que apresentam grupo ftalimido intacto, resultaram em boa atividade inibitória de TNF- $\alpha$  em modelo de inflamação aguda em pulmões de camundongos (MACHADO *et al.*, 2005). Estudando metabólitos da talidomida, Nakamura e colaboradores (2006) mostraram que adição de radical OH na posição 5 no grupo ftalimídico da talidomida e no grupo glutarimídico resultaram numa melhora significativa da atividade inibitória de TNF- $\alpha$  em modelo de monócitos leucêmicos humanos (THP-1). Em seguida, Nakamura e colaboradores (2007) sintetizaram compostos compreendendo produtos metabolizados da talidomida e mostraram em culturas THP-1 estimuladas com TPA (tetradecanoylphorbol acetate), que compostos hidrolisados apresentando grupo ftalimido aberto ou grupo glutarimídico aberto, ou até mesmo ambos os grupos abertos, podem apresentar perda, diminuir a atividade, manter, ou até mesmo aumentar a atividade inibitória de TNF- $\alpha$ .

Conforme demonstrado por Corral e colaboradores (1999), grupos de análogos da talidomida testados em PBMC estimuladas com LPS resultaram em efeitos com relação à modulação na produção de citocinas *in vitro*. Uma classe de compostos, classe I ou IMiDs mostrou não somente capacidade para inibir TNF- $\alpha$ , como também inibir marcadamente a produção de IL-1 $\beta$  e a produção de IL-12 por monócitos estimulados e baixa inibição de IL-6. Esses fármacos foram potentes estimuladores de IL-10 (MOREIRA *et al.*, 1993; MULLER *et al.*, 1996), apresentando atividade anti-neoplásica, antiangiogênica e atividade coestimulatória de células T (DREDGE, DALGLEIS e MARRIOTT, 2003). Em contraste a outras classes de compostos, classe II ou SelCiD (Selective Cytokine Inhibitory Drugs) apresentaram baixo efeito na inibição da produção de IL-1 $\beta$  e IL-12 por monócitos, sem inibir IL-6. Porém, mantiveram seu efeito inibitório de TNF- $\alpha$ . Além disso, estes compostos estimularam de forma modesta a produção de IL-10 (20-50%) (CORRAL e KAPLAN,

1999). Esta classe é conhecida como inibidora de PDE-4, com atividade antiangiogênica e anti-neoplásica com pequeno efeito co-estimulatório em células T (DREDGE, DALGLEIS e MARRIOTT, 2003). Outros pesquisadores descreveram que os efeitos dos SelCiDs foram mais similares a talidomida do que IMiDs (MOREIRA *et al*, 1993; MULLER *et al*, 1996).

Lima e colaboradores (2002) sintetizaram análogos híbridos da talidomida contendo o grupo ftalimido e estruturas da aril sulfonamidas, que são reconhecidas como inibidores seletivos de PDE-4 (MONTANA *et al.*, 1998). Como resultado, esses autores observaram que, em BALF de camundongos tratados com os compostos e estimulados com LPS, os análogos inibiram o influxo de neutrófilos e a produção de TNF- $\alpha$ , porém mostraram fraco efeito inibitório para produção de PDE-4 e PDE-3.

Compostos poliamínicos e diamínicos como a putrescina (1,4-diaminobutano) apresenta um papel chave em vários processos biológicos, apresentando diversas propriedades farmacológicas (PEGG, 1988; EDWARDS, 1990). No presente trabalho, vários análogos da talidomida foram escolhidos, apresentando grupo ftalimídico aberto na ligação entre o carbono e o nitrogênio (Fig. 5a), com ou sem a presença de grupos nitro (NO<sub>2</sub>). Cada composto apresenta duas subunidades ftalimídicas e foram preparadas pela condensação das diaminas com anidrido ftálico ou 3-nitroftálico. Além dessas duas unidades, o espaço entre elas compreende a uma diamina, variando segundo o número de carbonos.

Conforme demonstrado por Almeida e colaboradores (2007), análogos apresentando grupos amino (NH<sub>2</sub>) ou NO<sub>2</sub> na posição R (Fig. 5b), foram mais potentes na inibição de TNF- $\alpha$  do que a talidomida em PBMC humano estimulado com LPS, em consonância com resultados obtidos por Muller e colaboradores (1996). Além disso, Almeida e colaboradores (2007) observaram que o tipo e o tamanho do espaço entre as unidades ftalimídicas influenciaram na atividade biológica do composto. No presente estudo, os compostos apresentam as unidades ftalimídicas hidrolisadas (Fig. 5c).

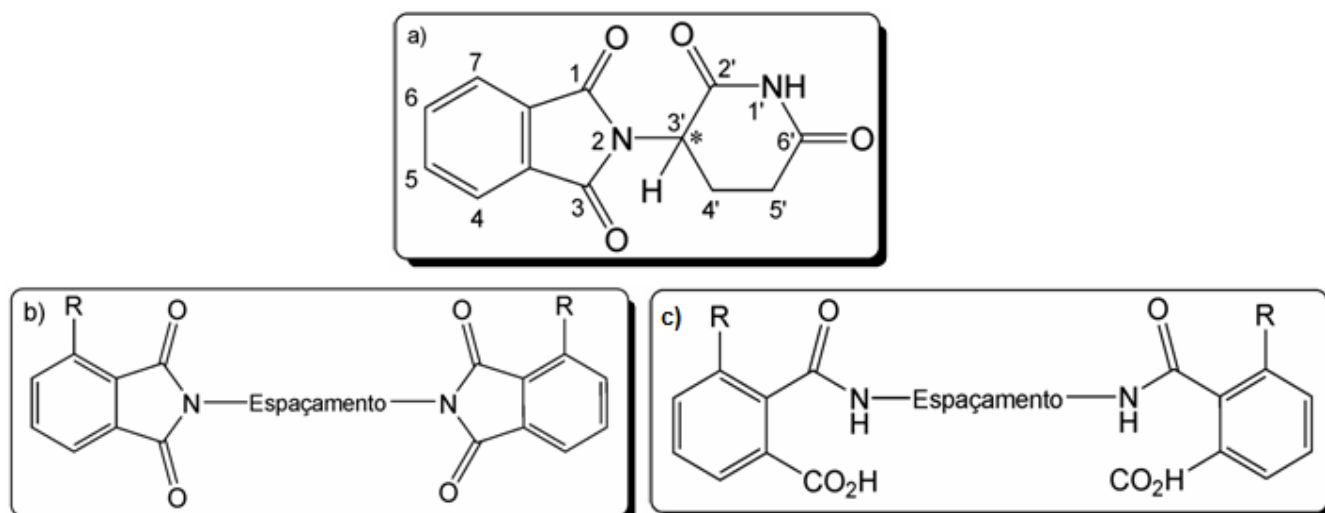


Figura 5 a) Representação estrutural da talidomida e a posição dos átomos, onde (\*) representa o centro quiral, b) representação da estrutura básica dos análogos da talidomida utilizando-se duas subunidades ftalimídicas fechadas e c) abertas.

Almeida e colaboradores (2007) foram os primeiros a relatar a influência do espaço entre as estruturas ftalimídicas na inibição da produção de TNF- $\alpha$ . Os autores também observaram que as diferenças observadas possivelmente são em função dos análogos da talidomida serem encontrados em diferentes meia-vida, estabilidade, solubilidade e potência e concluíram que o mecanismo correspondente a ação dos análogos estudados necessita de investigação. Os autores especularam que, de forma similar à talidomida, esses compostos poderiam exercer seus efeitos seletivamente diminuindo a estabilidade do mRNA do TNF- $\alpha$ ; inibindo PDE-4; ou ligando-se com alta afinidade a  $\alpha$ 1-AGP.

Logo, em virtude dos problemas apresentados com relação à talidomida, o presente trabalho teve como justificativa avaliar o efeito *in vitro* de novas moléculas derivadas da talidomida com subunidades ftalimídicas abertas, na tentativa de se obter novos compostos com maior solubilidade e melhor efeito biológico que a talidomida.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da talidomida e de novos análogos obtidos através da condensação de diaminas com anidrido ftálico ou 3-nitro-ftálico na ativação de macrófagos J774A.1 e células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar o efeito da talidomida e de novos análogos em macrófagos J774A.1 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  através dos seguintes parâmetros:

- Produção de nitrito/nitrato, TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 nos sobrenadantes de culturas;
- Expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86;
- Expressão do mRNA para TNF- $\alpha$  IL-12 e IL-10 e iNOS.

2.2.2. Avaliar o efeito da talidomida e de novos análogos em células L1210 através da avaliação da modulação da produção espontânea de IFN- $\gamma$ .

2.2.3. Avaliar o efeito da talidomida e de novos análogos em PBMC humano estimuladas com LPS quanto a produção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, CXCL9 e CXCL10 nos sobrenadantes de culturas de células.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Análogos utilizados nos experimentos

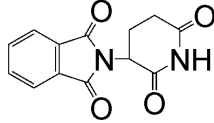
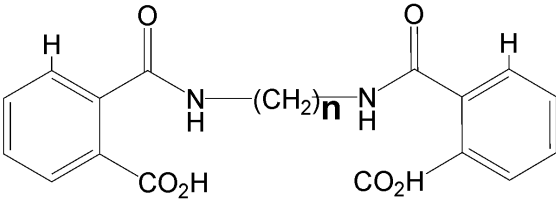
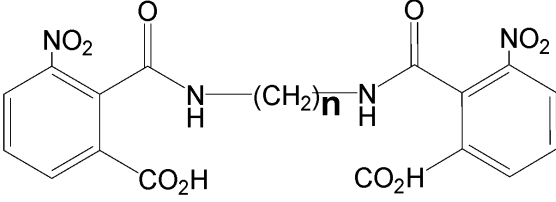
Foram sintetizados 8 análogos da talidomida cujas estruturas estão demonstradas no Quadro 1. A sigla (**n**) à frente do nome do composto representa o respectivo espaçamento entre as unidades ftalimídicas (número de carbonos) e a presença da letra A indica a presença do radical NO<sub>2</sub> (Quadro 1 e Fig. 6).

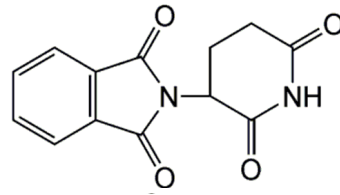
Os análogos da talidomida são resultantes da reação de condensação entre diaminas e anidrido ftálico ou 3-nitro-ftálico em temperatura ambiente (Fig. 7). As reações foram conduzidas no Laboratório de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo grupo do Dr. Mauro Vieira Almeida.

Os compostos utilizados foram solubilizados nos respectivos solventes no dia do uso em cada experimento. Evitou-se, assim, longos períodos de estocagem a -20°C em solução aquosa. Apenas os compostos no estado sólido foram mantidos estocados a -20°C. A concentração final dos compostos utilizados em cultura variou de 1 a 880 µM.

Conforme se observa no Quadro 1, à medida que o número de carbonos do espaçamento aumenta, o composto se torna mais hidrofóbico. Logo, para o composto **5**, foi necessário um solvente orgânico (DMSO, Sigma-Aldrich) para sua diluição. Contudo, a adição do grupo NO<sub>2</sub> ao composto **5** contribuiu para aumento de sua solubilidade em água.

Quadro 1 Resumo das características dos análogos quanto ao espaçamento, diluição e grupos presentes nas moléculas.

Fármaco	Nome	Estrutura	Solvente
Talidomida			DMSO
	$\alpha(N$ -ftalimido)glutarimida		
<b>Análogos</b>			
Ausência de NO <sub>2</sub>			
<b>Composto</b>			
<b>2</b>	<b>n = 2</b>	<i>N, N'</i> -Di-(2-carboxi-benzoil)-1,2-etilenodiamina	Água
<b>3</b>	<b>n = 3</b>	<i>N, N'</i> -Di-(2-carboxi-benzoil)-1,3-propanodiamina	Água
<b>4</b>	<b>n = 4</b>	<i>N, N'</i> -Di-(2-carboxi-benzoil)-1,4-butanodiamina	Água
<b>5</b>	<b>n = 6</b>	<i>N, N'</i> -Di-(2-carboxi-benzoil)-1,6-hexanodiamina	DMSO
<b>Análogos</b>			
Presença de NO <sub>2</sub>			
<b>Composto</b>			
<b>2A</b>	<b>n = 2</b>	<i>N, N'</i> -Di-(2-carboxi-3-nitro-benzoil)-1,2-etilenodiamina	Água
<b>3A</b>	<b>n = 3</b>	<i>N, N'</i> -Di-(2-carboxi-3-nitro-benzoil)-1,3-propanodiamina	Água
<b>4A</b>	<b>n = 4</b>	<i>N, N'</i> -Di-(2-carboxi-3-nitro-benzoil)-1,4-butanodiamina	Água
<b>5A</b>	<b>n = 6</b>	<i>N, N'</i> -Di-(2-carboxi-3-nitro-benzoil)-1,6-hexanodiamina	Água



Talidomida 1

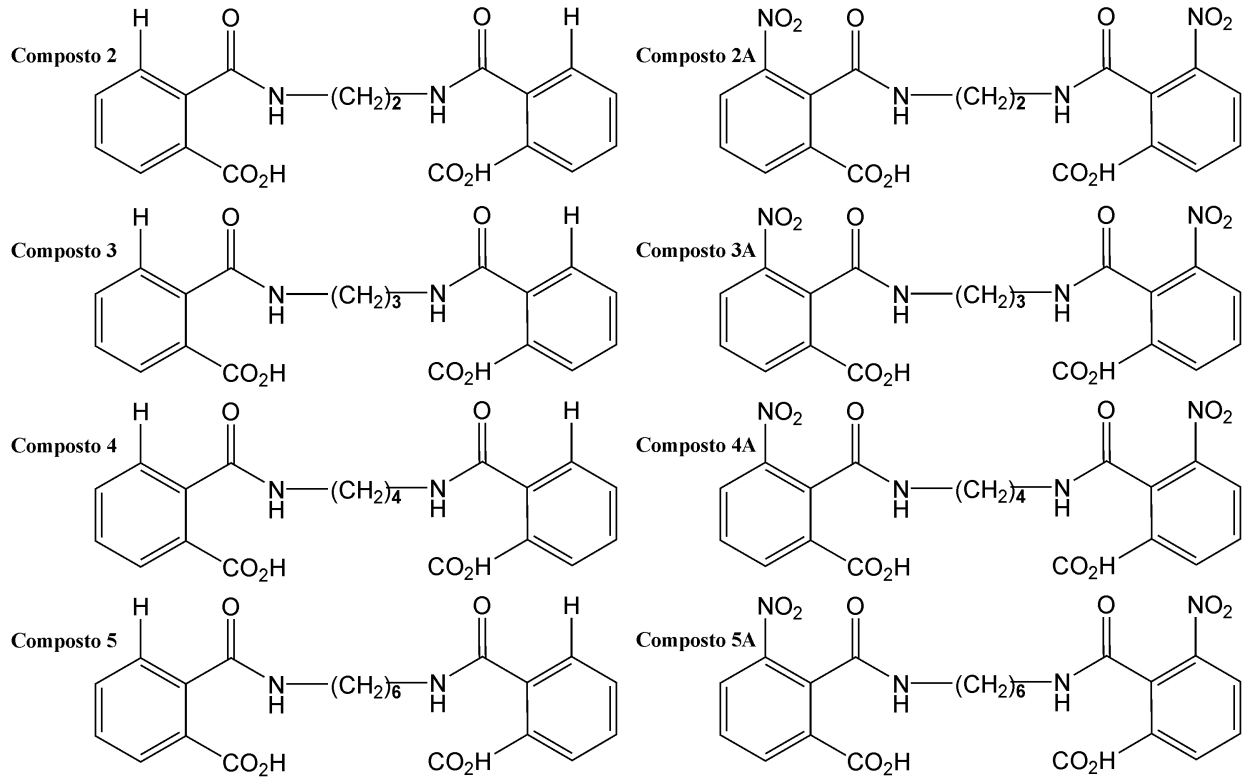


Figura 6 Representação da estrutura molecular dos análogos utilizados.

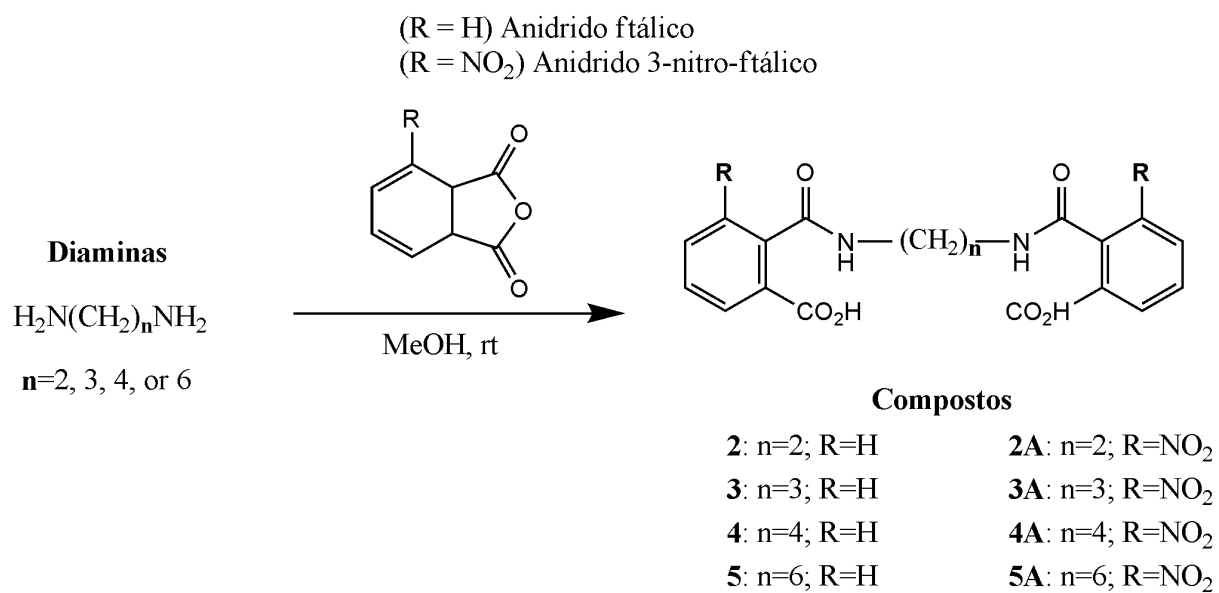


Figura 7 Representação das reações de síntese dos análogos da talidomida

### 3.2. Cultura e estimulação de células J774A.1 e de células L1210

A linhagem de células de macrófagos J774A.1 (ATCC número: TIB-67) murinos foi cultivada em garrafas de cultura (NUNC) em meio RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 50 UI/ml de penicilina, 1% de aminoácidos não-essenciais e 2% de L-glutamina (Gibco/BRL) a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. Após 5 dias, as células foram removidas dos frascos de cultura com uso de raspador de células (*cell scraper*) e centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm a 4°C. A viabilidade foi determinada por azul de Trypan (BDH Chemicals Ltd, England). Em seguida, 5 x 10<sup>5</sup> células/ml (ou 10<sup>5</sup> células/poço) foram distribuídas em cada poço da placa de 96 poços (GREHER) e incubadas na presença dos análogos em diferentes concentrações (1 a 880 µM).

Os compostos **2**, **3**, **4**, **2A**, **3A**, **4A** e **5A** foram diluídos inicialmente em água, resultando numa concentração inicial de 10,75 mM, sendo posteriormente diluídos em solução fisiológica para aplicação em culturas de células A talidomida e o composto **5** foram diluídos inicialmente em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo a concentração estoque da talidomida foi de 77,5 mM e do composto **5** de 26,5 mM. Em seguida, procedeu-se a diluições em solução fisiológica para aplicação em culturas de células. Após 1 hora de incubação a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> com a talidomida e os análogos, as culturas foram incubadas por 18 horas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> com os seguintes estímulos: BCG (10<sup>6</sup> CFU/ml; Fundação Ataulpho de Paiva, RJ); IFN-γ (0,4 ng/ml); LPS (0,1 e 1,0 µg/ml; Sigma, 0111:B4 Chemical Co., St. Louis, MO). Após o tempo de incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para quantificação da produção de NO e de TNF-α, IL-10 e IL-12.

Para os ensaios de produção de NO foi utilizado o inibidor específico da L-arginina (LNMA, Sigma) a 500 µM para controle positivo da inibição de NO. As células foram submetidas para avaliação da viabilidade pelo método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). A concentração final do DMSO utilizada em todos os experimentos foi de 0.1%. Para os experimentos de extração de RNA total, as células foram tratadas com os compostos 1 hora antes e em seguida adicionados LPS (1 µg/ml) e IFN-γ (0,4 ng/ml) e incubados por 2 e 6 horas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>.

As culturas com a da linhagem de células linfoblásticas leucêmicas murinas L1210 (ATCC número: CCL-219) foram realizadas seguindo a mesma metodologia descrita para as culturas de células J774A.1, exceto quanto a: concentração final de células que foi de  $2,5 \times 10^5$  células/ml (ou  $5 \times 10^4$  células/poço), tempo de incubação de 48 horas e quanto a ausência de estímulo exógeno, pois essas células foram modificadas para secretarem espontaneamente IFN- $\gamma$ .

### **3.3. Cultura e estimulação de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC)**

Para coleta de sangue periférico de indivíduos saudáveis, foram utilizados tubos vacutainer com heparina (Becton Dickinson, San Jose, CA). O volume de sangue coletado foi diluído 1:2 em tampão de salina fosfatada (PBS) estéril, para separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) por gradiente de densidade em Ficoll-Paque Plus (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden), através de centrifugação por 30 minutos, a 2000 rpm, à temperatura ambiente. A camada de PBMC coletada foi submetida a duas lavagens (1800 rpm/4° C/ 10min e 1500 rpm/ 4° C/ 10min) em PBS estéril e, em seguida, procedeu-se à contagem das células utilizando câmara de Neubauer. Durante o processo de contagem a viabilidade celular foi avaliada através da coloração por azul de Trypan. As células utilizadas no experimento não foram congeladas, sendo utilizadas sempre a fresco. Em seguida, ajustou-se a concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/ml (ou  $5 \times 10^4$  células/poço) em meio RPMI 1640, em placas de 96 poços (Millipore, Bedford, MA, USA) em meio RPMI suplementada com 2mM de L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100  $\mu$ g/ml de streptamicina, 10 $\mu$ l de aminoácidos não-essenciais e 10% de plasma humano autólogo. As células foram incubadas com talidomida e os análogos por 1 hora antes da adição de 2  $\mu$ g/ml LPS (Sigma, 0111:B4). As culturas foram incubadas a 37° C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de incubação, a viabilidade celular foi determinada por coloração em azul de Trypan e pelo do MTT. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para posterior análise de citocinas e quimiocinas.

### 3.4. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

Para determinação da concentração de NO, a conversão estável da produção de óxido nítrico em nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) foi mensurado usando-se o método de Griess. Após o período de incubação, sobrenadantes (100 $\mu\text{l}$ ) de cada poço da placa de cultura foram transferidos para placas de 96 poços e igual volume de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0.1% N-(1-naftil)-etileno diamina hidrocloreto, 2,5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , SIGMA) foi adicionado. Posteriormente, a absorbância foi avaliada em espectrofotômetro utilizando-se o comprimento de onda de 540 nm (Spectramax 190, Molecular Devices). As concentrações de nitrito foram derivadas de análise de regressão usando diluição seriada com o padrão nitrito de sódio. A porcentagem de inibição foi baseada na habilidade do análogo de inibir a produção de NO pelas células, em comparação ao controle estimulado não-tratado. O LNMA foi utilizado como controle positivo de inibição.

### 3.5. Avaliação da viabilidade celular

As células foram avaliadas quanto a viabilidade pelo método colorimétrico do MTT e por azul de Trypan. Para a coloração com azul de Trypan, 50  $\mu\text{l}$  de suspensão celular (L1210 e PBMC) foram homogeneizados com 50  $\mu\text{l}$  de solução de azul de Trypan (com 4 partes para 1 parte em NaCl 0.9%) e contados em câmara de Neubauer. Para o teste do MTT foram utilizados 5 mg/ml (MOSSMAN, 1983) do composto solubilizado em RPMI, adicionado-se 10  $\mu\text{l}$  por poço e incubando por 4 horas em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. A reação foi interrompida com 100  $\mu\text{l}$  de isopropanol/ácido clorídrico (solução de isopropanol/HCL a 0,4%) e lida em espectrofotômetro a 570 nm ( $\text{DO}_{570}$ ) (Spectramax 190-Molecular Devices) A viabilidade celular foi diretamente proporcional ao valor de DO (densidade ótica). O número de células viáveis foi expresso de acordo com as medidas colorimétricas e a seguinte fórmula (OLMO *et al.*, 2006):

$$\% \text{ Citotoxicidade: } [1 - (\text{DO}_{\text{células + composto}} / \text{DO}_{\text{células}})] \times 100$$



### 3.6. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes de culturas foram coletados e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  e avaliados quanto aos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10, para culturas de J774 A.1; IFN- $\gamma$ , para cultura de L1210; e TNF- $\alpha$  para culturas de PBMC através do ELISA. Foram utilizados anticorpos específicos cuja ligação à citocina foi detectada usando-se um complexo *peroxidase horseradish* streptavidina biotinilada (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA), TMB e peróxido de hidrogênio. A reação foi finalizada com a adição de 1 M de ácido sulfúrico, de acordo com o fabricante da B&D Pharmingen. A leitura da densidade óptica foi feita a 450 nm ( $\text{DO}_{450}$ ) em um leitor de ELISA (Spectramax 190-Molecular Devices). As amostras foram quantificadas em comparação com a curva padrão, utilizando-se recombinante purificado, e os valores expressos em pg/ml. A porcentagem de inibição calculada foi em função da fórmula (%):  $100 \times [1 - (\text{citocina (tratado)} / \text{citocina (controle)})]$ . Foi calculada também a capacidade que os análogos apresentaram, a uma determinada concentração, de inibir 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) da produção da citocina avaliada.

### 3.7. Citometria de Fluxo

Foi utilizado o ensaio citométrico de esferas ordenadas (CBA) a fim de se determinar a produção de IFN- $\gamma$ , IL-6, IP-10/CXCL10 e MIG/CXCL9 nas culturas de PBMC humano. Para as culturas com células J774A.1, avaliou-se a expressão de CD80 e CD86. Esse tipo de ensaio é capaz de quantificar simultaneamente várias moléculas em um volume pequeno de amostra, em comparação com os imunoenaios tradicionais (MORGAN *et al*, 2004).

### 3.8. Técnica de CBA

Os sobrenadantes de cultura de PBMC humano foram descongelados e centrifugados por 10 minutos a 3700 rpm, a  $25^{\circ}\text{C}$ , com objetivo de se remover as impurezas. Foram utilizados 5  $\mu\text{l}$  dessas amostras para quantificação da produção de citocinas e quimiocinas. Em cada tubo com essas alíquotas, foram adicionados 20  $\mu\text{l}$

de diluente G. Posteriormente, as amostras receberam 3 $\mu$ l de cada reagente, para marcar a produção de cada citocina (IFN- $\gamma$  e IL-6) e das quimiocinas (CXCL10 e CXCL9) e foram lavadas com 500 $\mu$ l de reagente F e centrifugadas a 1300 rpm durante 7 minutos. Em cada tubo os sobrenadantes foram aspirados com bomba de vácuo, restando aproximadamente 100 $\mu$ l de amostras marcadas. Em seguida, foram adicionados 18 $\mu$ l de revelador (reagente B) em cada amostra, para incubação à temperatura ambiente por 1 hora e 30 minutos. Após esse período, as amostras foram novamente lavadas, centrifugadas e aspiradas nas mesmas condições citadas acima. Foram colocados em cada tubo 100 $\mu$ l de reagente F para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura de padrões e amostras, os dados foram analisados no software BD CBA Isotype Analysis, onde os valores foram dados em concentração (pg/ml) de cada citocina. Todos os reagentes fazem parte de kits (Human Th1/Th2 cytokine II) e (Human Chemokine Kit I) adquiridos da Becton Dickinson (San Jose, CA, USA). A porcentagem calculada de inibição foi dada segundo a fórmula (%):  $100 \times [1 - (\text{citocina}(\text{tratado}) / \text{citocina}(\text{controle}))]$ .

### **3.9. Avaliação da expressão de CD80 e CD86 em J774A.1 através de citometria de fluxo**

Após os períodos de cultura, os sobrenadantes foram coletados para posterior análise de citocinas e NO. As células aderentes da cultura foram removidas com o uso de solução salina a 4°C e coletadas. Em seguida, foram lavadas com PBS por 10 minutos 4°C 1200 rpm e 50  $\mu$ l da suspensão de células de cada amostra foram marcadas com 10 $\mu$ l de anticorpos contra CD80 e CD86 diluídos em 320  $\mu$ l de solução de PBS e SFB 2% + 0,1% azida. Depois de 30 minutos de incubação, as amostras foram capturadas para avaliação da expressão dos marcadores de superfície no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). As análises foram feitas utilizando 1,000 eventos para cada amostra. As células marcadas foram selecionadas através de tamanho e granulosidade e analisadas através do software CellQuest<sup>R</sup> (BD). A intensidade de fluorescência média (IFM) foi obtida através da análise dos histogramas gerados, onde o eixo das

abscissas corresponde ao log da fluorescência FITC e o das ordenadas correspondendo a contagem relativa de células.

### **3.10. Extração de RNA total de células J774A.1, síntese da primeira fita de cDNA, PCR e RT-PCR em tempo real**

As células foram removidas da cultura utilizando-se solução salina a 4°C e transferidas para tubos e lavadas por 10 minutos a 4°C, a 1200 rpm. Em seguida, foram armazenadas em tubos eppendorfs para posterior processo de extração. Após o preparo da amostra, o RNA total foi extraído utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen Hilden, Germany) respeitando as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado no espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000) a 260 nm e sua integridade verificada em gel de agarose 2%.

O RNA total extraído das culturas de células J774A.1 apresentou concentração média de 250 ng/μL e boa relação 260/280. Esta razão foi utilizada para avaliar a pureza do RNA uma vez que diversas proteínas celulares possuem pico de absorvância em 280 nm. O ideal é que esta razão esteja próximo de 2,0 para amostras de RNA já que a absorvância da molécula de RNA é duas vezes maior em 260 nm em relação a 280nm. O valor obtido nas amostras variou de 2,05 a 2,13, indicando boa pureza das amostras.

O RNA total após extração manteve-se íntegro uma vez que foi possível observar as bandas referentes ao RNA 18S e 28S (dado não mostrado).

A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), em que foram adicionados 1μL oligo(dT)<sub>20</sub> (50 μM), 1 μL de *Anneling Buffer* à 5μL de RNA total, 1 μL H<sub>2</sub>O Free-Water, obtendo-se um volume final de 8μL. A reação foi incubada a 65°C durante 5 minutos e, posteriormente, em gelo por 1 minuto.

Em seguida, foram adicionados 10 μL de 2X *First-Strand Reaction Mix* e 2 μL de *SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação foi incubada à temperatura de 50°C durante 50 minutos e a 85°C por 5 minutos para inativação enzimática, sendo então resfriada no gelo. O cDNA produzido foi quantificado e armazenado a -20°C até o momento da reação de PCR em tempo real.

A quantidade de cDNA para amplificação foi otimizada em 60 ng para o gene da iNOS e 30 ng para os demais genes. A concentração ideal de *primer* e temperatura de dissociação para cada gene estão descritas na Tabela 1. O controle endógeno escolhido para normalização das amostras foi o HPRT, pois apresentou menor variação de Ct (cycle threshold) entre os grupos tratados com os compostos e o controle não tratado (em comparação ao endógeno  $\beta$ -Actina que apresentou variação). O Ct é definido como o número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência emitido durante a amplificação utilizando-se o corante Syber Green ultrapasse o valor inicial estabelecido (normalmente no início da fase log da reação). É importante que a expressão do gene controle endógeno não seja influenciada pelo tratamento, no caso, utilização dos compostos. As análises das curvas de dissociação dos genes alvo e do controle endógeno não mostraram picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos. A ausência destes constitui-se condição para estudos de expressão quando se utiliza o corante Syber Green, pois este se liga a qualquer dupla fita de DNA podendo ocasionar valores superestimados de expressão. Exemplos destas curvas de dissociação podem ser vistos nas Figuras 8 e 9.

Tabela 1 Concentração de *primer* e temperatura de dissociação (TD) de cada gene analisado.

<b>Gene</b>	<b>Primer (nM)</b>	<b>TD (°C)</b>
TNF- $\alpha$	150	81.3
IL-10	300	82.1
IL-12	150	80.5
iNOS	150	82.1
HPRT	300	78.9

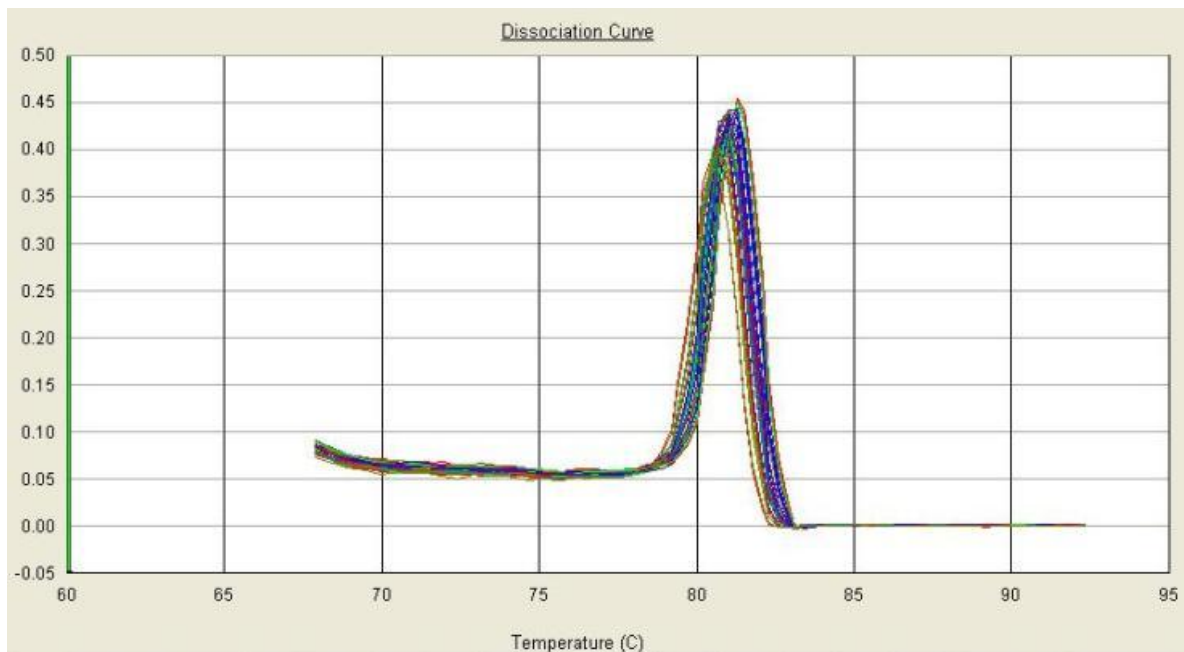


Figura 8 Curva de dissociação do gene HPRT.

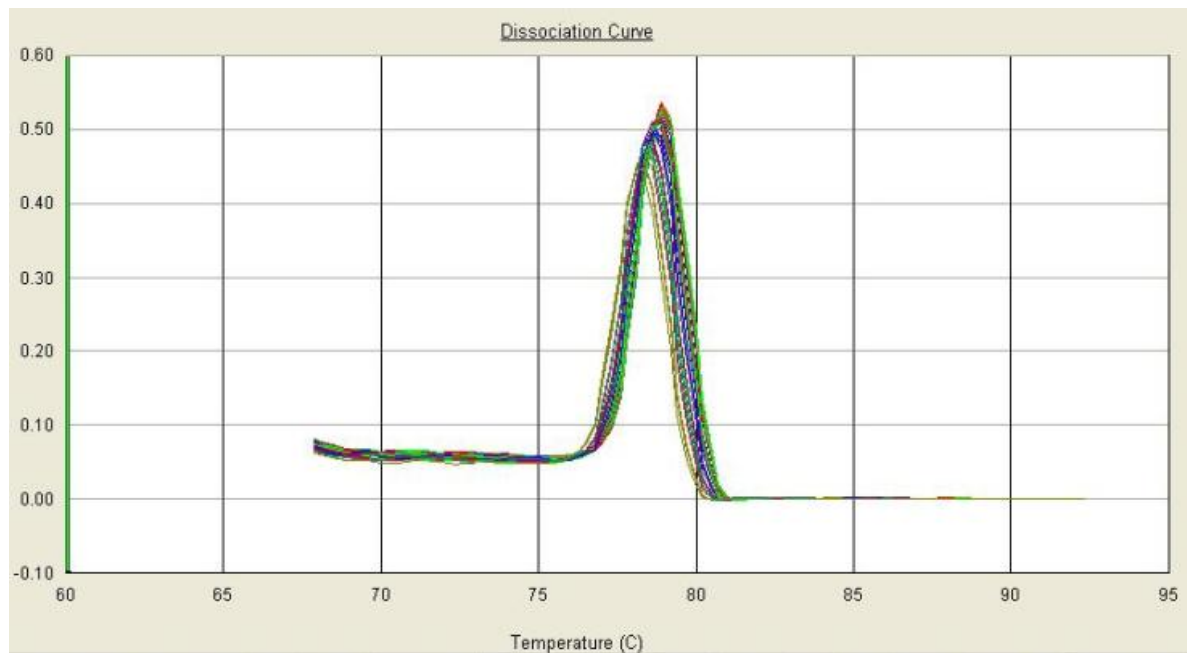


Figura 9 Curva de Dissociação do gene TNF- $\alpha$ .

A curva padrão construída utilizando as condições definidas após a otimização permitiu o cálculo da eficiência de PCR de cada gene. A Tabela 2 mostra a eficiência de PCR de cada gene, assim como o coeficiente de correlação de cada

regressão linear obtida da curva padrão. As reações de PCR para os genes HPRT e iNOS apresentaram a maior (1,956) e menor (1,801) eficiência de PCR, respectivamente.

Tabela 2 Eficiência (E) e coeficiente de correlação (r) das curvas padrão de cada gene analisado.

<b>Gene</b>	<b>E</b>	<b>r</b>
TNF- $\alpha$	1,91	1,00
IL-10	1,865	1,00
IL-12	1,829	1,00
iNOS	1,801	1,00
HPRT	1,956	1,00

### 3.11. RT-PCR em tempo real dos genes TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e iNOS

Os *primers* utilizados neste estudo foram sintetizados pela Prodimol (Brasil) (Tabela 3).

Tabela 3 Sequência dos *primers* utilizados nos ensaios de PCR convencional e PCR em tempo real

<b>Gene</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>	<b>Referência</b>
TNF- $\alpha$	F	GAAACACAAGATGCTGGGACAGT	Jayakumar <i>et al.</i> , 2008
	R	CATTCGAGGCTCCAGTGAATTC	
IL-12p40	F	AACCATCTCCTGGTTTGCCA	Jayakumar <i>et al.</i> , 2008
	R	CGGGAGTCCAGTCCACCTC	
IL-10	F	CACAAAGCAGCCTTGCAGAA	Jayakumar <i>et al.</i> , 2008
	R	CTGGCCCCTGCTGATCCT	
iNOS	F	CTTCAACCCCAAGGTTGTCTGCAT	Raso <i>et al.</i> , 2002
	R	ATGTCATGAGCAAAGGCGCAGAAC	
$\beta$ -Actina	F	CGTTGACATCCGTAAAGACCTC	Jayakumar <i>et al.</i> , 2008
	R	AGCCACCGATCCACACAGA	
HPRT	F	CAAAGCCTAAGATGAGCGCAA	Jayakumar <i>et al.</i> , 2008
	R	AGGCAGATGGCCACAGGAC	

Os genes hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HPRT) e  $\beta$ -actina foram testados a fim de avaliar o melhor controle endógeno, sendo que este deve ser expresso nas células e apresentar níveis de expressão inalterados com o tratamento.

Foi realizado PCR convencional para avaliar em gel de acrilamida a 8% a temperatura de anelamento dos primers. Este é um passo importante pois permite verificar em que temperatura os primers irão se associar a sequências alvo de DNA para amplificação de forma específica e também evitando-se a formação de dímeros de primers. No presente estudo, verificou-se que a temperatura de 60°C de anelamento foi melhor que a de 56°C, onde se observou formação maior de dímeros e amplificações inespecíficas.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o kit iTaq SYBR Green Supermix With ROX (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. Neste Kit estão incluídos todos os componentes para realização das reações de PCR: 2X reaction buffer, 0,4 mM dATP, 0,4 mM dGTP, 0,8 mM dUTP, iTaq DNA polymerase (50 units/mL), 6 mM  $Mg^{+2}$ , SYBR Green I dye, 1  $\mu$ M ROX, exceto o par de *primers* e cDNA. As reações constaram de 12,5  $\mu$ L desse mix, 5  $\mu$ L de cDNA, 150 ou 300  $\mu$ M de *primer* e água, totalizando um volume final de 25  $\mu$ L. Antes da quantificação em tempo real, as reações de PCR foram otimizadas para todos os genes. Para tanto, foram testadas três quantidades de cDNA (30, 60 e 120 ng) e duas diluições de *primer* (150, 300  $\mu$ M). As condições de amplificação para todos os sistemas foram: 95°C durante 3 minutos para ativação da iTaq DNA polimerase; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos; e anelamento e extensão a 60°C durante 60 segundos. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, a fim de validar a ausência de produtos não específicos e dímeros de *primers*. Para isso, as amostras foram aquecidas com incremento de 1°C durante 30 segundos, partindo de 60°C até atingir o limite de 94°C.

Para a determinação das melhores condições para a reação de PCR, a partir do programa REST, obteve-se a curva padrão para cada gene, em que diluições seriadas de cDNA (30, 60, 120 ng/ $\mu$ L) foram plotadas contra seus respectivos Ct para cálculo da eficiência de PCR, já que na quantificação relativa é necessário que

a eficiência de amplificação do alvo e do controle endógeno sejam aproximadamente iguais.

Cada amostra foi testada em duplicata em placas óticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seladas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e amplificadas no *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cada gene alvo foi amplificado em poços diferentes, uma vez que o corante utilizado foi o SBYR Green. Utilizou-se o programa REST 2008 para análise da expressão relativa e determinação do índice de significância.

### **3.12. Análise estatística**

Para análise de normalidade dos dados foi empregado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os grupos de dados paramétricos foram comparados utilizando-se o teste análise de variância (ANOVA one-way), sendo o teste de Tukey utilizado como pós-teste. Para dados não paramétricos utilizou-se o teste Mann-Whitney, comparando-se entre dois tratamentos.

Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados indicativos de diferença estatística entre os grupos estudados. Para os dados referente a avaliação da cinética da produção do TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO por células J774A.1, foi utilizado ANOVA (two-way), sendo o teste de Bonferroni utilizado como pós-teste. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).



## 4 RESULTADOS

### 4.1. Padronização dos estímulos para avaliação da ativação de células J774A.1

Os macrófagos desempenham importante papel na resposta imune, compreendendo a primeira linha de defesa na imunidade inata, auxiliando também na resposta imune adaptativa. A produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos reflete o seu estado de ativação e está envolvido em ações efetoras dessas células (VAN GINDERACHTER *et al.*, 2006).

Com o objetivo de verificar a ativação das células J774A.1, foram testados diferentes tipos de estímulos: LPS (0,1 e 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ), IFN- $\gamma$  (0,4 ng/ml), BCG ( $10^6$  CFU/ml), LPS + IFN- $\gamma$ , e BCG + IFN- $\gamma$ . A produção de NO foi testada em culturas de macrófagos J774A.1 ( $10^5$  células/poço) após incubação por 24 horas e 48 horas, a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, em presença ou ausência dos estímulos citados anteriormente (Fig. 10).

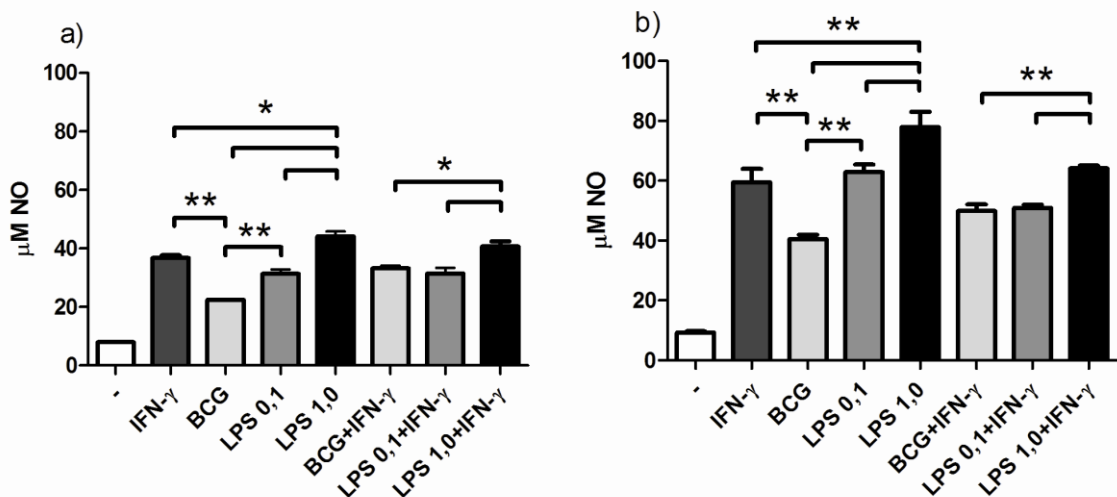


Figura 10 Produção de NO por macrófagos J774A.1 estimulados. Células J774A.1 foram cultivadas por 24 h (a) e 48 h (b) com LPS (0,1 e 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ), BCG ( $10^6$  CFU/ml), IFN- $\gamma$  (0,4 ng/ml), BCG + IFN- $\gamma$ , LPS + IFN- $\gamma$ . A produção de NO foi avaliada no sobrenadante de cultura pelo método de Griess. (-) controle não estimulado. (\*) $p < 0,01$ ; (\*\*) $p < 0,001$ .

Apesar de todos os estímulos terem ativado as células J774A.1, o estímulo com 1,0  $\mu\text{g/ml}$  de LPS associado ou não com IFN- $\gamma$  induziu maior produção de NO em comparação aos demais estímulos usados.

#### 4.2. Cinética da produção do TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO por células J774A.1 estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$

As culturas de células J774A.1 ( $10^5$  células/poço) foram estimuladas com LPS (1,0  $\mu\text{g/ml}$ ) em presença ou ausência de IFN- $\gamma$  (0,4 ng/ml) por 4, 6, 8, 12, 16, 18, 24 e 48 horas para avaliação da produção de TNF- $\alpha$  (Fig. 11).

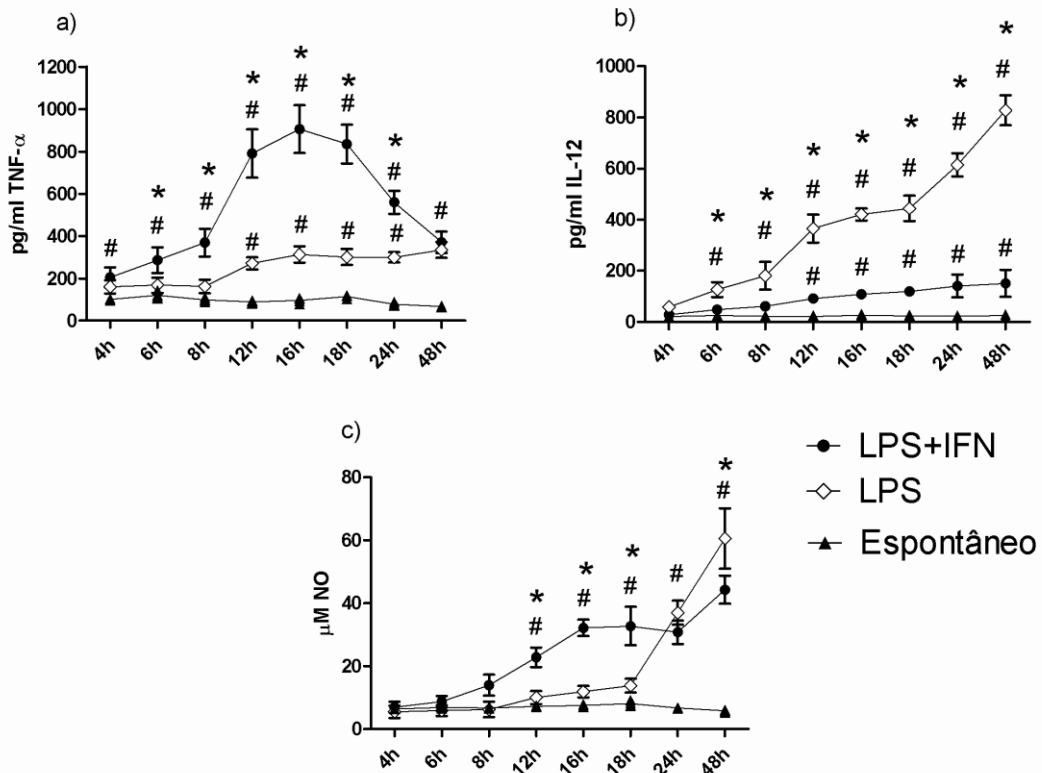


Figura 11 Avaliação da produção de TNF- $\alpha$  (a), IL-12 (b) e NO (c) em sobrenadantes de culturas de macrófagos J774 A.1. As culturas foram estimuladas com LPS (1,0  $\mu\text{g/ml}$ ) com (●) ou sem (◇) IFN- $\gamma$  (0,4 ng/ml) e também comparadas ao controle não estimulado (▲). (\*) $p < 0,05$  em relação ao outro estímulo usado e (#) $p < 0,05$  em relação ao controle espontâneo.

A estimulação das culturas com LPS/IFN- $\gamma$  ou apenas LPS induziu uma maior produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO em relação às culturas não estimuladas. Conforme se observa, na presença do estímulo LPS/IFN- $\gamma$  a produção de TNF- $\alpha$  (Fig. 11a) é maior a partir de 4 h de cultura, se mantendo elevada até 48 h em relação ao espontâneo. Contudo, na presença de LPS, esta diferença começa a ser observada a partir de 12 h. Quanto a produção de IL-12 (Fig. 11b), o estímulo LPS/IFN- $\gamma$  induziu maior produção a 12 h se mantendo elevada até 48 h em relação ao espontâneo e na presença de LPS este aumento foi observado a partir de 6 h de

cultura. Com relação a produção de NO (Fig. 11c), ambos os estímulos induziram maior produção em relação ao espontâneo a partir de 12 h de cultura.

A produção de TNF- $\alpha$  foi maior na presença de LPS/IFN- $\gamma$  a partir das 6 horas até as 24 horas de cultura, em comparação com as culturas estimuladas apenas com LPS, havendo um pico na produção de TNF- $\alpha$  após 16 horas (Fig. 11). Com relação a produção de IL-12 foi observado um aumento gradual a partir de 6 horas de cultura com pico em 48 horas na presença de LPS sem IFN- $\gamma$  (Fig. 11b). Na Figura 12c observa-se que a produção de NO apresentou um pico após 48 horas de cultura na presença de LPS ( $p > 0,05$ ). Entretanto, no intervalo de 12 a 18 horas de cultura, os níveis de NO foram maiores após estimulação com LPS/IFN- $\gamma$ .

Em resumo, a ativação de macrófagos J774A.1 para produção de TNF- $\alpha$  e NO foi maior utilizando o estímulo com LPS/IFN- $\gamma$ , havendo maior produção desses fatores no período de 12 a 18 horas de cultura. Contudo, neste mesmo período de cultura, uma maior produção de IL-12 foi alcançada após estimulação com LPS.

De posse dos resultados, foi escolhido o tempo de 18 horas de cultura para a avaliação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO em culturas de células J774.1 ativadas. Escolheu-se o estímulo LPS/IFN- $\gamma$  para ser utilizado nos testes com os análogos da talidomida, visto que este estímulo induziu maior produção de TNF- $\alpha$ , sendo também capaz de induzir significativa produção de NO e IL-12, em relação às culturas não estimuladas.

### **4.3. Avaliação do efeito do DMSO na citotoxicidade e produção de TNF- $\alpha$ em células J774A.1**

A talidomida apresenta baixa solubilidade em água, sendo necessária uma diluição em DMSO. Foram realizados testes para averiguar o possível efeito citotóxico do DMSO em células J774A.1. Foram usadas as concentrações de 0,05%, 0,1%, 0,25%, 0,5% e 10% de DMSO. A citotoxicidade foi avaliada após 18 horas de cultura através do método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2 -il)-2,5-difeniltetrazolium) e pela avaliação da inibição da produção de TNF- $\alpha$  após estimulação com LPS/IFN- $\gamma$  (Fig. 12).

Os resultados mostram que a concentração de 10% de DMSO foi capaz de induzir citotoxicidade nas células J774A.1 após 18 horas de cultura. As demais

concentrações de DMSO não interferiram na viabilidade celular em comparação ao controle não tratado com DMSO (Fig. 12a). Quanto a produção de TNF- $\alpha$ , observa-se que as concentrações 0,5% e 0,25% interferiram na produção desta citocina (Fig. 12b). Além disso, as concentrações 0,5% e 0,25% interferiram na produção de NO, IL-12 e IL-10 (dados não mostrados).

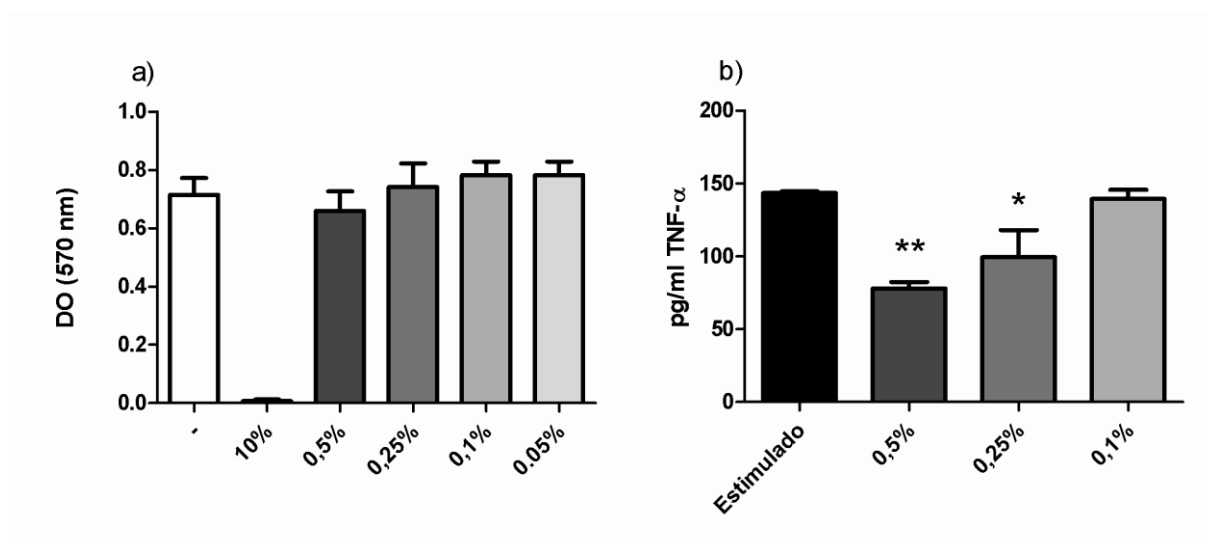


Figura 12 Avaliação do efeito do DMSO na citotoxicidade e na produção de TNF- $\alpha$  por células J774 A.1. A citotoxicidade das células J774 A.1 foi avaliada pelo método do MTT (a) e produção de TNF- $\alpha$  pelo ELISA (b). As células foram estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$  por 18 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os dados representam a média de 6 replicatas. (\*) $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,001$  versus controle estimulado.

A concentração de 0,1% de DMSO se mostrou satisfatória para uso nas culturas de J774A.1, sendo utilizada em todos os tratamentos em que a talidomida e o composto **5** foram diluídos em DMSO. O mesmo procedimento para avaliação da toxicidade do DMSO foi realizado para as culturas de células L1210 e cultura de células PBMC humano tratadas com talidomida, havendo resultados semelhantes (dados não mostrados).

#### 4.4. Avaliação do efeito dos análogos da talidomida na produção de citocinas por células J774A.1

No presente estudo foram sintetizados análogos da talidomida com duas subunidades ftalimídicas hidrolisadas apresentando ou não radical NO<sub>2</sub> e interligadas por espaçamentos contendo diaminas, que variam quanto ao número de carbonos (2, 3, 4 e 6 carbonos). Na Tabela 4 são mostrados o efeito dos análogos

da talidomida na produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, NO e IL-10 por células J774A.1 estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$ .

#### **4.4.1. Efeito da talidomida e dos compostos na produção de TNF- $\alpha$ por células J774A.1**

Nos compostos sem o grupo NO<sub>2</sub> (**2**, **3**, **4** e **5**), à medida que aumentou o número de carbonos entre os nitrogênios amídicos de 2 para 4, aumentou a atividade inibitória para a produção de TNF- $\alpha$ . A talidomida apresentou discreta atividade inibitória para TNF- $\alpha$  a 110  $\mu$ M, não significativa. Nos análogos que apresentam o radical NO<sub>2</sub> (**2A**, **3A**, **4A**, e **5A**), a atividade inibitória para TNF- $\alpha$  foi maior em geral à medida que houve aumento do espaçamento de **3A** para **5A**. Contudo, o análogo **2A** (espaçamento menor) apresentou elevada atividade inibitória para TNF- $\alpha$ . Em geral, os análogos com o radical NO<sub>2</sub> apresentaram aumento da atividade inibitória de TNF- $\alpha$  conforme se observa na comparação entre os análogos **5** e **5A** e entre **2** e **2A** (Tabela 4).

Quanto ao efeito citotóxico avaliado por MTT em culturas de J774A.1, apenas o composto **4** apresentou efeito na viabilidade celular, onde na concentração de 110  $\mu$ M a porcentagem de células viáveis em relação ao controle não tratado foi de 74,5% (dados não mostrados).

#### **4.4.2. Efeito da talidomida e dos compostos na produção de IL-12 por células J774A.1**

A atividade inibitória da talidomida para a produção de IL-12 foi significativa a 110  $\mu$ M. Para os análogos sem o grupo NO<sub>2</sub>, o aumento do espaçamento, conforme observado para inibição de TNF- $\alpha$ , resultou em melhora da atividade inibitória para IL-12, exceto para o composto **5**. Quando na presença do radical NO<sub>2</sub>, a atividade inibitória para IL-12 também elevou-se com aumento do espaçamento de **2A** para **5A**. A adição do grupo NO<sub>2</sub>, considerando-se o efeito citotóxico do análogo **4**, não contribuiu para o aumento da atividade inibitória dos compostos quanto a produção de IL-12, conforme se observa para os análogos **2** e **2A** e entre **3** e **3A**. Contudo, o

mesmo não ocorre com os compostos **5** e **5A**, onde a adição resultou em significativa melhora da atividade inibitória para produção de IL-12 (Tabela 4).

#### **4.4.3. Efeito da talidomida e dos compostos na produção de NO por células J774A.1**

Quanto a produção de NO, foi utilizado o inibidor específico LNMA como controle positivo de inibição de NO. Na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , o LNMA inibiu cerca de 47% da produção de NO (dado não mostrado). A talidomida não apresentou atividade inibitória significativa para produção de NO. Entre os análogos sem o radical  $\text{NO}_2$ , o aumento do espaçamento resultou em maior atividade inibitória para produção de NO, em relação aos compostos **2**, **3** e **4**, mas o mesmo não foi observado para o composto **5**. Nos compostos com a presença do radical  $\text{NO}_2$ , os análogos **2A** e **5A** apresentaram melhor atividade em comparação aos demais do mesmo grupo. A presença do grupo  $\text{NO}_2$  não resultou em melhora geral da atividade inibitória para produção de NO, onde esta correspondência apenas foi observada entre os compostos **2** e **2A**, e **5** e **5A** (Tabela 4).

#### **4.4.4. Efeito da talidomida e dos compostos na produção de IL-10 por células J774A.1**

A produção de IL-10 foi elevada nas culturas incubadas com os compostos **3**, **2A** e **5A**. De forma interessante, o aumento na produção de IL-10 foi correlacionado com significativo efeito inibitório quanto a produção de  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-12 e NO (Tabela 4).

Tabela 4 Produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, NO e IL-10 por células J774A.1 ativadas por LPS/IFN- $\gamma$ : efeito do tratamento com talidomida e seus análogos

Composto	TNF- $\alpha$ <sup>a)</sup>	IL-12 <sup>a)</sup>	NO <sup>a)</sup>	IL-10 <sup>a)</sup>
Talidomida	14	23*	2	9
2	12	27*	4	7
3	44*	68*	25*	(-35)*
4	45*	42*	47*	15
5	8	14*	9	21*
2A	32*	17*	23*	(-22)*
3A	8	18*	12*	11
4A	18*	28*	6	6
5A	60*	66*	30*	(-35)*

a)  $10^5$  células J774A.1 foram incubadas por 1 h com os diferentes compostos (110  $\mu$ M). A seguir, as culturas foram estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/ml) e IFN- $\gamma$  (0,4 ng/ml). Após 18 h, a concentração de TNF- $\alpha$ , IL-12, NO e IL-10 no sobrenadante das culturas foi determinada por ELISA. As culturas foram realizadas em quadruplicatas de n=3. Os valores representam a porcentagem de inibição (valores positivos) ou estimulação (valores negativos) em relação ao controle estimulado com LPS/IFN- $\gamma$  e não tratado com os compostos, através da fórmula:  $100 \times [1 - (\text{citocina (tratado)} / \text{citocina (controle)})]$ . Até a concentração de 20  $\mu$ M dos compostos **3**, **2A** e **5A**, foi possível observar atividade inibitória significativa. (\*)  $p < 0,05$  versus controle estimulado não tratado.

Em resumo, os análogos estudados apresentaram atividade inibitória para TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e NO, havendo influência do espaçamento e da presença ou não do radical NO<sub>2</sub>. Os compostos **3**, **2A** e **5A** mostraram capacidade de estimular a produção de IL-10.

#### 4.5. Avaliação do efeito dos análogos da talidomida em células L1210

O efeito dos análogos da talidomida na produção de IFN- $\gamma$  por células L1210 é mostrado na Figura 13. Células L1210 foram usadas devido a sua capacidade de produzir IFN- $\gamma$  na ausência de estímulo. Foram selecionados os compostos **3**, **2A** e **5A** por apresentarem significativa atividade inibitória para TNF- $\alpha$  e IL-12 e baixo efeito citotóxico em células J774A.1.

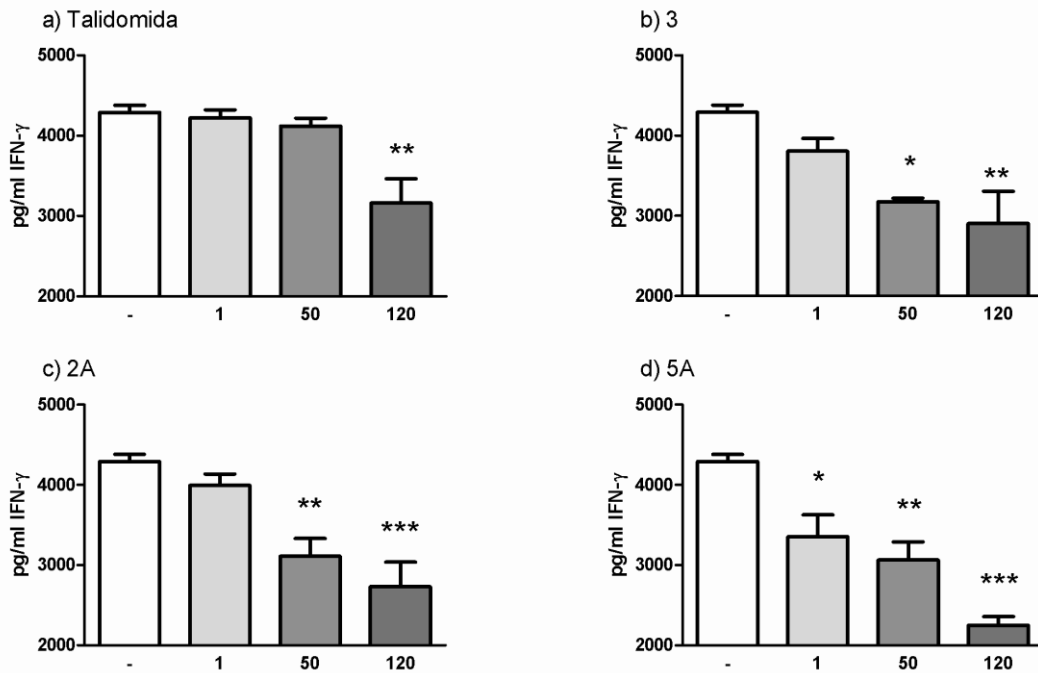


Figura 13 Efeitos dos análogos na produção de IFN- $\gamma$  por células L1210.  $5 \times 10^4$  células L1210 foram incubadas por 48 h na presença dos compostos **3**, **2A**, **5A** e talidomida, nas concentrações de 1  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 120  $\mu$ M. (\*)p < 0,05, (\*\*)p < 0,01 e (\*\*\*)p < 0,001 versus controle não tratado (-).

Os compostos **3**, **2A** e **5A** apresentaram maior capacidade de inibir a produção de IFN- $\gamma$  em comparação com a atividade inibitória da talidomida. Estes resultados reforçam o potencial anti-inflamatório destes análogos já observados quanto a inibição da produção TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO.

Na Tabela 5, observa-se o efeito citotóxico dos compostos na cultura de células L1210. Somente a maior concentração (120  $\mu$ M) promoveu um pequeno efeito citotóxico.

Tabela 5 Efeito citotóxico da talidomida e seus análogos em células L1210

Concentração do composto ( $\mu$ M)	Citotoxicidade em células L1210(%)			
	Talidomida	3	2A	5A
120	13,5	14,5	9,8	15,9
50	NC	NC	NC	NC
1	NC	NC	NC	NC

ND - não detectado efeito citotóxico



#### 4.6. Avaliação da influência dos compostos 3, 2A e 5A na expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 em células J774A.1

O efeito dos análogos 3, 2A e 5A na expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) em células J774A.1 ativadas com LPS/IFN- $\gamma$ , foi avaliado após 18 horas de cultura através de citometria de fluxo. Os compostos 3, 2A e 5A apresentaram atividade inibitória significativa para CD80 (Fig. 14), nas concentrações de 20 $\mu$ M, 110 $\mu$ M e 440 $\mu$ M, semelhante ao observado com a talidomida.

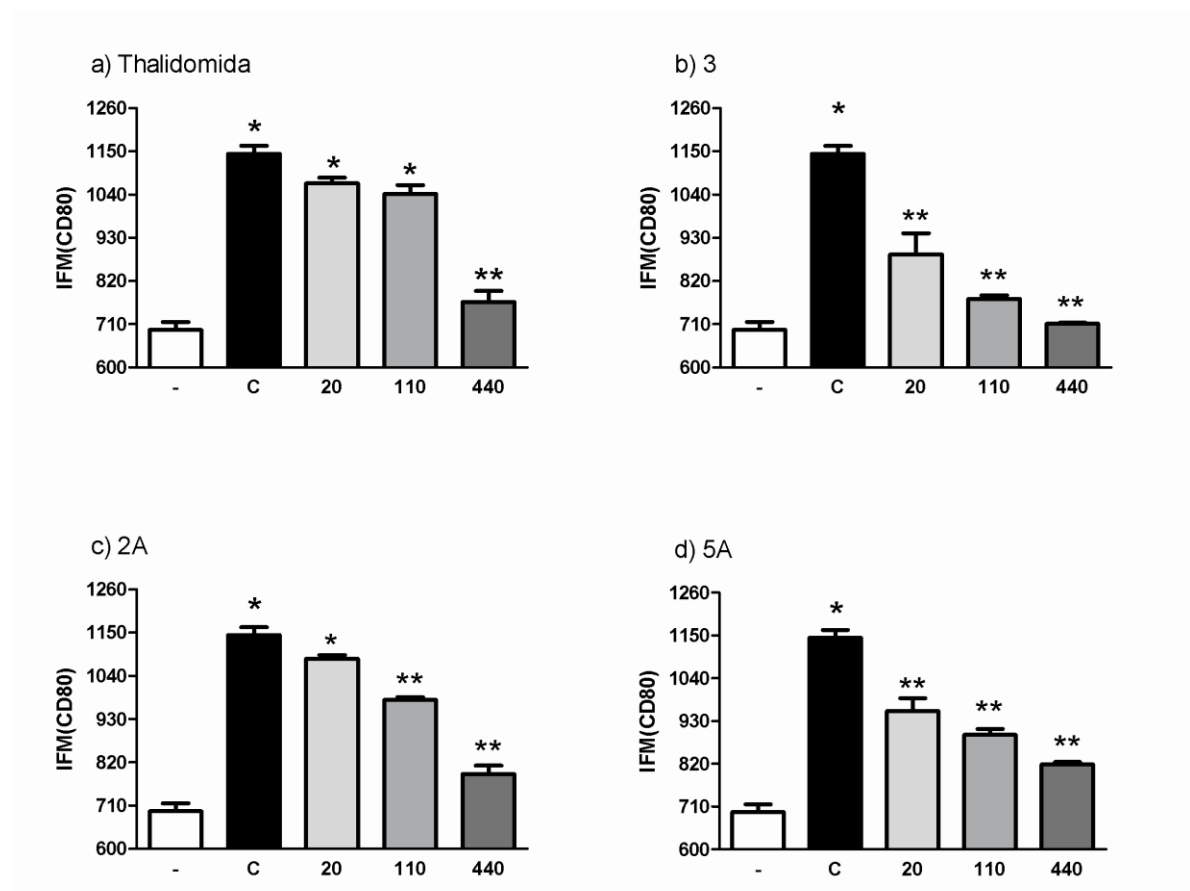


Figura 14 Avaliação da expressão da molécula co-estimulatória CD80 na superfície de células J774A.1 estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$ . As células foram tratadas com a talidomida e os análogos 3, 2A e 5A nas concentrações de 20 $\mu$ M, 110 $\mu$ M e 440 $\mu$ M, sendo a expressão de CD80 avaliada por citometria de fluxo e comparada ao controle estimulado (C) após 18 h de incubação. IFM - intensidade de fluorescência média. (\*) $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,01$  versus (C).

É válido ressaltar que a partir da concentração de 440  $\mu\text{M}$  não foi observado efeito citotóxico dos compostos avaliado pelo método do MTT. A expressão de CD86 (Fig. 15), entretanto, somente foi inibida pelos compostos **3** e **2A** na concentração de 440  $\mu\text{M}$ .

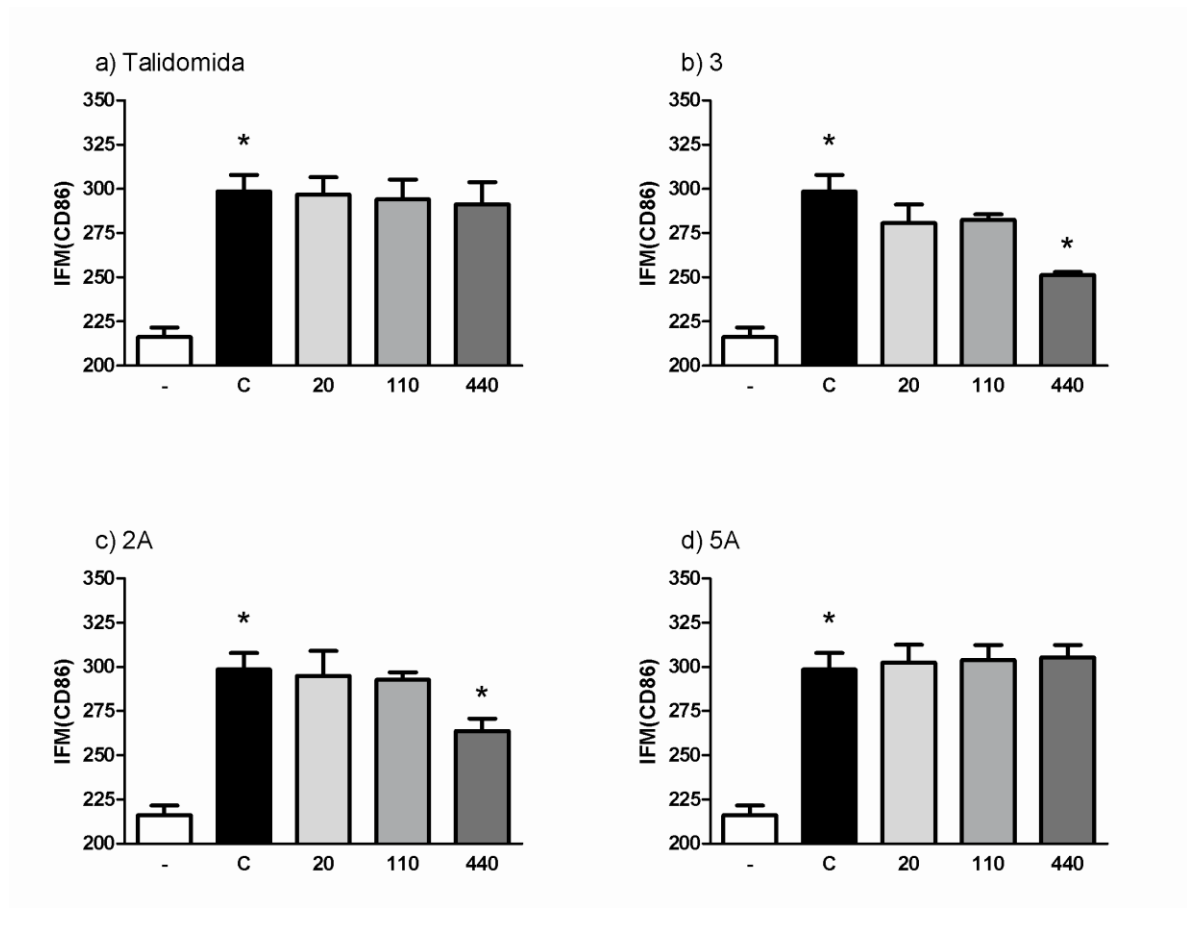


Figura 15 Avaliação da expressão da molécula co-estimulatória CD86 na superfície de células J774A.1 estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$ . As células foram tratadas com a talidomida e os análogos **3**, **2A** e **5A** nas concentrações de 20 $\mu\text{M}$ , 110 $\mu\text{M}$  e 440 $\mu\text{M}$ , sendo a expressão de CD86 avaliada por citometria de fluxo e comparada ao controle estimulado (C) após 18 h de incubação. IFM - intensidade de fluorescência média. (\*)p < 0,05 versus (C).

Estes resultados sugerem que os compostos **3**, **2A** e **5A** e a talidomida tiveram uma atividade inibitória para expressão de CD80 a nível de superfície de células J774A.1 ativadas com LPS/IFN- $\gamma$ . Somente os análogos **3** e **2A** influenciaram de forma significativa na expressão de CD86 na concentração de 440  $\mu\text{M}$ .

#### 4.7. Efeito dos análogos da talidomida na expressão do mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e iNOS por células J774A.1 estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$

Moreira e colaboradores (1993) demonstraram que a talidomida possui a capacidade de influenciar na degradação do mRNA de TNF- $\alpha$ , diminuindo sua meia vida.

Células J774A.1 foram estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$  por 2 e 6 horas de cultura em presença ou ausência dos compostos **3**, **2A** e **5A** e foi avaliada a produção de mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e iNOS através do RT-PCR em tempo real. Os dados obtidos foram normalizados com o controle de expressão endógena, o HPRT, utilizando-se o programa REST 2008. A expressão relativa obtida dos dados previamente normalizados foi resultante da comparação entre os controles estimulados e tratados com os análogos e relação ao controle estimulado não tratado. Os resultados da expressão relativa de mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-12, iNOS e IL-10 são mostrados na Tabela 6 para cultura de 2 horas e Tabela 7 para cultura de 6 horas.

Tabela 6 Efeito do tratamento com talidomida e seus análogos na expressão relativa da produção de mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-12, iNOS e IL-10 em células J774A.1 estimuladas por 2 h com LPS/IFN- $\gamma$

Composto	LPS/IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$ <sup>a)</sup>	IL-12 <sup>a)</sup>	iNOS <sup>a)</sup>	IL-10 <sup>a)</sup>
Talidomida	+	1,37 $\pm$ 0,15	1,48 $\pm$ 1,13	2,43 $\pm$ 0,26	0,69* $\pm$ 0,06
3	+	1,42 $\pm$ 0,05	1,13 $\pm$ 0,54	0,74* $\pm$ 0,21	1,01 $\pm$ 0,10
2A	+	1,13 $\pm$ 0,1	1,46 $\pm$ 0,88	0,95 $\pm$ 0,33	1,21* $\pm$ 0,11
5A	+	1,3 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,38	1,06 $\pm$ 0,16	1,43* $\pm$ 0,26
Controle não tratado	-	0,48* $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,16	0,07* $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,17

a) 10<sup>5</sup> células J774A.1 foram incubadas por 1 h com a talidomida e os análogos **3**, **2A** e **5A** (440  $\mu$ M). A seguir, as culturas foram estimuladas com LPS (1 $\mu$ g/ml) e IFN- $\gamma$  (0,4 ng/ml). Após 2 h, a concentração do mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e iNOS foi avaliada por RT-PCR em tempo real. As culturas foram realizadas em dez replicatas. Os valores representam a expressão relativa, onde valores acima de 1 significam aumento da produção e abaixo de 1 uma menor produção em relação ao controle estimulado não tratado. (\*)p < 0,05 versus controle estimulado com LPS/IFN- $\gamma$  não tratado.

Os resultados da tabela 6 indicam que tanto a talidomida quanto os análogos não influenciaram de forma significativa no acúmulo do mRNA para TNF- $\alpha$  e para IL-

12, em células J774A.1 estimuladas por 2 horas com LPS/IFN- $\gamma$ . A talidomida induziu maior acúmulo de mRNA para iNOS, que, no entanto, não foi também significativo. Apenas o composto **3** influenciou de forma a diminuir significativamente o acúmulo do mRNA para iNOS. Quanto a IL-10, a talidomida influenciou de forma a reduzir significativamente o acúmulo do mRNA para IL-10 e os compostos **2A** e **5A** influenciaram aumentando este acúmulo de forma significativa.

Tabela 7 Efeito do tratamento com talidomida e seus análogos na expressão relativa da produção de mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-12, iNOS e IL-10 em células J774A.1 estimuladas por 6 h com LPS/IFN- $\gamma$

Composto	LPS/IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$ <sup>a)</sup>	IL-12 <sup>a)</sup>	iNOS <sup>a)</sup>	IL-10 <sup>a)</sup>
Talidomida	+	0,37* $\pm$ 0,02	0,39* $\pm$ 0,257	3,52 $\pm$ 2,04	0,72* $\pm$ 0,27
<b>3</b>	+	0,72* $\pm$ 0,08	4,52* $\pm$ 0,80	3,54* $\pm$ 0,72	1,48* $\pm$ 0,33
<b>2A</b>	+	0,56* $\pm$ 0,06	3,57* $\pm$ 1,08	3,51* $\pm$ 0,33	1,25* $\pm$ 0,19
<b>6A</b>	+	0,57* $\pm$ 0,09	3,32* $\pm$ 0,96	2,65* $\pm$ 0,12	1,50* $\pm$ 0,21
Controle não tratado	-	0,41* $\pm$ 0,1	0,91 $\pm$ 0,82	0,93* $\pm$ 0,02	1,68* $\pm$ 0,53

a)  $10^5$  células J774A.1 foram incubadas por 1 h com a talidomida e os análogos **3**, **2A** e **5A** (440  $\mu$ M). A seguir, as culturas foram estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/ml) e IFN- $\gamma$  (0,4 ng/ml). Após 6 h, a concentração do mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e iNOS foi avaliada por RT-PCR em tempo real. As culturas foram realizadas em dez replicatas. Os valores representam a expressão relativa, onde valores acima de 1 significam aumento da produção e abaixo de 1 uma menor produção em relação ao controle estimulado não tratado (\*)p < 0,05 versus controle estimulado com LPS/IFN- $\gamma$  não tratado.

Em culturas de 6 horas (Tab. 7), a talidomida e os compostos **3**, **2A** e **5A** induziram uma diminuição significativa do acúmulo do mRNA para TNF- $\alpha$ . Por outro lado, os compostos **3**, **2A** e **5A** induziram um aumento significativo da produção do mRNA para IL-12. Em contraste, a talidomida apresentou capacidade de inibir o acúmulo do mRNA para IL-12 (p<0,05).

Os análogos **3**, **2A** e **5A** e a talidomida induziram aumento da produção de mRNA de iNOS. Contudo, este aumento não foi significativo para a talidomida. Os compostos **3**, **2A** e **5A** contribuíram para aumento da produção do mRNA para IL-10 (Tabela 7). O papel exercido pelos compostos que resultou em aumento do mRNA para IL-10 corresponde ao aumento observado na produção de IL-10 avaliado por ELISA (Tabela 7 e Tabela 4). Em contrapartida, a talidomida que induziu a inibição

da produção de IL-10 avaliado no sobrenadante de células J774A.1 ativadas com LPS/IFN- $\gamma$ , inibiu também a produção do mRNA para IL-10.

Resultados semelhantes foram observados quando na concentração de 20  $\mu$ M (dados não mostrados). Apesar do efeito inibitório do acúmulo de mRNA ter sido menor em relação a concentração de 440  $\mu$ M, os compostos **3**, **2A** e **5A** inibiram significativamente o acúmulo do mRNA para TNF- $\alpha$ , aumentando a concentração do mRNA para IL-10, IL-12 e iNOS. Contudo, a talidomida não modulou significativamente o acúmulo de mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e iNOS.

Em geral, nestes estudos os compostos analisados exerceram efeitos pós-transcricionais envolvendo diminuição do acúmulo de mRNA de TNF- $\alpha$  e aumento da produção de mRNA para IL-12 e iNOS. Com relação a produção de mRNA para IL-10, o acúmulo observado sugere eventos transcricionais. Além disto, o efeito observado é dependente da concentração utilizada.

#### **4.8. Avaliação do efeito dos análogos na ativação de PBMC humano**

A capacidade de inibição dos compostos foi também avaliada em culturas de células do PBMC humano *in vitro*. Com isso, foi possível observar se os compostos que apresentaram significativa atividade inibitória em macrófagos J774A.1 ativados também apresentaram capacidade de inibir a resposta inflamatória em células humanas estimuladas com LPS. Além disto, foi possível investigar se os análogos tiveram melhor atividade inibitória em comparação aos compostos estudados por Almeida e colaboradores (2007), onde os grupos ftalimídicos dos análogos da talidomida não foram hidrolisados como no presente estudo.

Os resultados são mostrados na Tabela 8, bem como o efeito citotóxico avaliado por azul de Trypan e MTT na respectiva concentração. Observa-se que no grupo sem o radical NO<sub>2</sub>, quando se aumenta o espaçamento de 2 para 3 e 4 carbonos, há aumento da atividade inibitória, com exceção do composto **5**. No grupo com o radical NO<sub>2</sub>, o aumento do espaçamento de 3 carbonos para 4 e 6 carbonos resultou em melhora da atividade inibitória de TNF- $\alpha$ . O composto **2A** (menor espaçamento) apresentou expressiva atividade inibitória, com cerca de 44 vezes mais eficiente que a talidomida. Em geral, a adição do radical NO<sub>2</sub> contribuiu para uma melhora da atividade inibitória de TNF- $\alpha$  em relação aos compostos **2**, **4** e **5**.

Em linhas gerais, os análogos apresentaram atividade diferenciada devido a influência do espaçamento e pela presença ou não do radical NO<sub>2</sub>.

Tabela 8 Inibição da produção de TNF- $\alpha$  induzida por LPS em PBMC humano tratadas com talidomida e seus análogos

Composto	IC <sub>50</sub> TNF- $\alpha$ em ( $\mu$ M) <sup>a)</sup>	Citotoxicidade	
		MTT(% <sup>b)</sup>	Trypan (% <sup>c)</sup>
Talidomida	220	100	100
2	240	99	99
3	55	100	99
4	166	100	98
5	458	100	90
2A	5	100	99
3A	95	100	98
4A	68	100	100
5A	6,1	100	100

a)  $5 \times 10^4$  células do PBMC foram incubadas por 1 h com a talidomida e os compostos **2**, **3**, **4**, **5**, **2A**, **3A**, **4A** e **5A**. Em seguida, as culturas foram estimuladas com LPS (2  $\mu$ g/ml). Após 24 h, a concentração TNF- $\alpha$  na cultura foi determinada por ELISA.

b) Viabilidade celular determinada por MTT. Foi representada em porcentagem relativa ao controle de células, pela fórmula:  $100\% \times \text{DO } 570, \text{ tratado} / \text{DO } 570, \text{ controle}$ .

c) Viabilidade celular determinada por azul de Trypan, sendo os valores referente a porcentagem de células viáveis.

Foi observado neste estudo que os compostos **3**, **2A** e **5A**, que apresentaram expressiva atividade inibitória para produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, NO em J774A.1 e IFN- $\gamma$  em L1210, também mostraram inibição de TNF- $\alpha$  avaliado em PBMC. Os compostos **3**, **2A** e **5A** foram também analisados quanto a capacidade de inibir outros importantes mediadores da resposta imune, como IFN- $\gamma$ , IL-6 e as quimiocinas CXCL9 e CXCL10 por células do PBMC ativadas com LPS (Tabela 9). Tanto a talidomida quanto compostos **3**, **2A** e **5A** apresentaram capacidade de inibir a produção de IFN- $\gamma$  por PBMC ativadas ( $p < 0,05$ ), sendo esta inibição maior para o composto **5A**. Além disto, o composto **5A** foi também o maior inibidor da produção de CXCL9 e CXCL10 que são induzidas por IFN- $\gamma$ .

A produção de IL-6 também foi significativamente inibida pela talidomida e pelos compostos **3**, **2A** e **5A** que apresentaram o nível de inibição maior que a talidomida.

Tabela 9 Inibição da produção de IL-6, IFN- $\gamma$ , CXCL10 e CXCL9 por PBMC humano estimuladas com LPS e tratadas com talidomida e seus análogos

Composto	IC <sub>50</sub> IFN- $\gamma$ em ( $\mu$ M) <sup>a)</sup>	(% Inibição a 100 $\mu$ M <sup>b)</sup>		
		CXCL9	CXCL10	IL-6
Talidomida	105	35*	46*	27*
3	107	35*	22*	40*
2A	146	28*	41*	42*
5A	45	36*	65*	39*

a)  $5 \times 10^4$  células do PBMC foram incubadas por 1 h com a talidomida e os análogos **3**, **2A** e **5A**. A seguir, as culturas foram estimuladas com LPS (2  $\mu$ g/ml). Após 24 h, a concentração de IFN- $\gamma$  foi determinada por ELISA e os dados colocados de acordo com o IC<sub>50</sub> obtido.

b) A produção de CXCL9, CXCL10 e IL-6 foi determinada por citometria de fluxo pelo método do CBA. Os resultados dos tratamentos foram apresentados em porcentagem de inibição (%) comparados ao controle estimulado não tratado através da fórmula:  $100 \times [1 - (\text{citocina}(\text{tratado}) / \text{citocina}(\text{controle não tratado}))]$ . (\*) $p < 0,05$  versus controle estimulado com LPS e não tratado.

Em geral, os compostos selecionados apresentaram elevada atividade inibitória em comparação a talidomida quanto a inibição da produção de TNF- $\alpha$  por PBMC ativada com LPS e, além disto, influenciaram na produção de outras citocinas e quimiocinas relacionadas, mostrando potencial efeito na modulação de respostas inflamatórias.

## 5 Discussão

A talidomida é utilizada no tratamento de doenças inflamatórias crônicas relacionadas a processos autoimunes, tais como lupus eritematoso e artrite reumatóide, na Hanseníase, e no tratamento de variados tipos de câncer (SINGHAL *et al.* 1999; KARIM *et al.*, 2001; KUMAR, WITZIG e RAJKUMAR, 2002; ZHU *et al.*, 2003; MORGAN *et al.*, 2006; NAKAMURA *et al.*, 2006). Esse fármaco tem como limitação seu efeito teratogênico e outros efeitos colaterais relacionados, por exemplo, a processos neurológicos adversos (HUANG, HSU, e CHIU, 2008). A eficácia da talidomida no tratamento de doenças inflamatórias e outras patologias tem direcionado pesquisas para a busca de análogos da talidomida com atividade biológica semelhante, menor toxicidade e ausência de efeitos teratogênicos. Neste trabalho estudamos novos análogos da talidomida que apresentam dois grupos ftalimídicos separados por diaminas. Os principais achados deste trabalho indicam que: **1)** Os compostos estudados apresentaram capacidade de inibir a produção de TNF- $\alpha$  em células J774A.1 e PBMC; **2)** A produção de IL-12 e NO foi reduzida em macrófagos J774A.1 tratados com os compostos, no entanto, os mesmos induziram aumento da produção de IL-10; **3)** A atividade inibidora dos compostos sobre a produção de TNF- $\alpha$  correlaciona com inibição do acúmulo de mRNA de forma dependente do tempo de cultura das células. Esses compostos, em contraste, ampliaram o acúmulo no citoplasma de mRNA para IL-10; **4)** Os compostos inibiram a expressão de CD80, mas não de CD86 em células J774A.1; **5)** A atividade inibidora dos compostos foi observada sobre a produção de IFN- $\gamma$  em PBMC humanas e correlacionou com a diminuição da produção de IFN- $\gamma$  em culturas de L1210; **6)** Os compostos mostraram capacidade de inibir a produção de IL-6 e de quimiocinas induzidas pelo IFN- $\gamma$  produzidas por PBMC humano.

### 5.1. Inibição da produção de TNF- $\alpha$ por células J774A.1 e células do sangue periférico humano tratadas com os análogos da talidomida

Diversos trabalhos reportaram que análogos apresentando grupo ftalimido fechado e com modificações no grupo glutarimido ou mesmo hidroxilações no grupo



ftalimido e/ou glutarimido resultaram em melhora da atividade inibitória para a produção de TNF- $\alpha$  (MULLER *et al.*,1996; CORRAL *et al.*,1996; MULLER *et al.*, 1999; SAMPAIO *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2005; NAKAMURA *et al.*, 2006). Utilizando-se metabólitos hidrolisados da talidomida, Nakamura e colaboradores (2007) observaram que o grupo ftalimido aberto ou grupo glutarimídico aberto ou até mesmo ambos os grupos abertos podem apresentar perda, manter a atividade, diminuir ou até mesmo aumentar a atividade inibitória de TNF- $\alpha$ . Almeida e colaboradores (2007) demonstraram pela primeira vez que em análogos da talidomida apresentando duas subunidades ftalimídicas, o espaçamento entre as subunidades contendo diaminas influenciou na atividade inibitória da produção de TNF- $\alpha$ . O presente trabalho mostra que análogos da talidomida que apresentam na sua composição duas unidades ftalimídicas separados por diaminas e na presença ou não do grupo NO<sub>2</sub> na sua estrutura tem a capacidade de inibir marcadamente a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos J774A.1 e também por PBMC humano. Neste estudo, ao contrário do estudo realizado por Almeida e colaboradores (2007), foram usados compostos com a subunidade ftalimídica aberta que apresentam como vantagem o fato de serem hidrossolúveis.

A solubilidade é uma importante consideração em termos de biodisponibilidade sistêmica do fármaco, uma vez que compostos pouco solúveis limitam a eficácia do fármaco e a necessidade de aumento subsequente da dose compromete a tolerância ao fármaco pelo paciente (MARRIOT *et al.*, 1998). Os compostos com subunidade ftalimídica aberta apresentaram boa solubilidade em água e elevada atividade inibitória para produção de TNF- $\alpha$ . Em relação aos compostos utilizados por Almeida e colaboradores (2007), a inibição da produção de TNF- $\alpha$  observada com compostos com grupo ftalimídico aberto foi maior que a alcançada com compostos que apresentavam grupo ftalimídico fechado.

Nossos resultados mostram que análogos contendo estrutura ftalimídica aberta apresentaram atividade inibitória sobre a produção de TNF- $\alpha$  maior à medida que se aumentou o espaçamento (de 2 a 4 carbonos) entre as unidades ftalimídicas, nos compostos sem grupo NO<sub>2</sub>, tanto em culturas de J774A.1 quanto em culturas de PBMC humano. Com o espaçamento de 6 carbonos, no entanto, esta atividade diminuiu em ambos os modelos de cultura de células. Uma possível explicação para este efeito reside no fato de que, o aumento do espaçamento entre as subunidades

ftalimídicas torna a molécula menos hidrofílica (tendo em vista que o composto 6 é solúvel em DMSO), além de interferir com possíveis sítios de interação com moléculas no meio biológico, como sítios ativos de enzimas. Dentre os compostos com o grupo NO<sub>2</sub>, o aumento do espaçamento (de 3 a 6 carbonos), resultou também na melhora da atividade inibitória tanto em culturas de J774A.1 quanto em culturas de PBMC humano. Contudo, neste estudo, o composto **2A** apresentou expressiva atividade inibitória em ambos os modelos de cultura, que pode ter relação com a estrutura ftalimídica hidrolisada deste composto, uma vez que o equivalente não hidrolisado descrito por Almeida e colaboradores (2007) não apresentou elevada atividade inibitória. Em geral, a adição do grupo NO<sub>2</sub> resultou na melhora da atividade inibitória observada na produção de TNF- $\alpha$  pelos compostos com 2, 4 e 6 carbonos em culturas de PBMC e os compostos com 2 e 6 carbonos em culturas de J774A.1. Tanto o aumento do espaçamento quanto a adição do grupo NO<sub>2</sub> resultando em melhora da atividade inibitória para produção de TNF- $\alpha$  estão em concordância com os achados de Almeida e colaboradores (2007) para compostos com subunidade ftalimídica fechada.

A talidomida possui um centro quiral, sendo uma mistura racêmica onde um dos enantiômeros possui ação antiemética, antiinflamatória, dentre outras, e o outro enantiômero tem efeito teratogênico. Mesmo após a separação da mistura racêmica da talidomida, ocorre no organismo a interconversão entre os enantiômeros, formando novamente uma mistura racêmica. Uma importante característica dos análogos do presente estudo reside no fato de que estes não apresentam centro quiral, evitando assim a etapa de separação de racemato e reduzindo a possibilidade de possíveis efeitos colaterais indesejáveis.

No presente estudo, são apresentados novos análogos da talidomida com potencial elevado para inibir a produção de TNF- $\alpha$ . Zhu e colaboradores (2003) propuseram que a subunidade ftalimídica intacta é necessária para atividade inibitória de TNF- $\alpha$ . Neste trabalho mostramos que a modificação da estrutura ftalimídica possibilitou melhor solubilidade e aumento da atividade inibitória em comparação a análogos diamínicos com grupo ftalimídico não hidrolisado já descritos.

## 5.2. Efeito dos análogos da talidomida na produção de IL-12, IL-10 e NO por células J774A.1

### Produção de IL-12

Diversos trabalhos observaram um efeito da talidomida sobre a produção de IL-12. Foi demonstrado pela primeira vez por Moller e colaboradores (1997) que a talidomida possui a capacidade de inibir a produção de IL-12 em PBMC estimulado com LPS. Corral e colaboradores (1999) demonstraram o efeito inibitório da talidomida e de compostos amino substituídos na produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  em PBMC estimulado com LPS. Ye e colaboradores (2006) demonstraram o efeito inibitório da talidomida para a produção de IL-12(p40) em macrófagos alveolares humanos estimulados *in vitro* com LPS. Estudando pacientes com ENL, Haslet e colaboradores (2005) observaram aumento da produção de IL-12 durante o decorrer do tratamento. Os autores sugeriram que o controle exercido pela talidomida mediante a estas circunstâncias estaria relacionado a ativação de células T regulatórias, visto que num grupo de 5 pacientes houve aumento da expressão de Foxp3 ao longo do tratamento. No presente estudo, a talidomida e os compostos apresentaram significativa atividade inibitória de IL-12 em células J774A.1 ativadas por LPS/IFN- $\gamma$ . Nos análogos sem o radical NO<sub>2</sub>, esta atividade foi maior para os compostos com espaçamento 2 e 3, e no grupo de compostos que apresentam o radical NO<sub>2</sub>, esta atividade foi maior nos análogos com espaçamento 4 e 6. Esses resultados confirmam dados apresentados na literatura sobre a capacidade inibitória da talidomida sobre a produção de IL-12 (MOLLER *et al.*, 1997; CORRAL, *et al.*, 1999; BAUDITZ *et al.*, 2002; YE *et al.*, 2006), e mostram que os análogos com dois grupos ftalimídicos hidrolisados apresentam forte atividade inibitória para IL-12. Diversos estudos sugerem que a IL-12 possui um importante papel na patogenia de doenças como sarcoidose, doença de Crohn e esclerose múltipla (SHIGEHARA *et al.*, 2001; MANNON *et al.*, 2004; RAMSARANSING *et al.*, 2004; HATA *et al.*, 2007). Logo, dada a importância da IL-12 nestas doenças, o presente estudo mostra novos compostos análogos a talidomida com atividade inibitória para IL-12 e com potencial efeito benéfico no tratamento destas patologias.

### **Produção de óxido nítrico (NO)**

O NO é uma molécula de grande importância biológica por desempenhar diversas funções no organismo, estando envolvido, por exemplo, em atividades microbicidas, antivirais, antiparasitárias e atitumorais (BOGDAN, 2001; PACHER, BECKMAN, e LIAUDET, 2007). Contudo, a produção excessiva de NO relaciona-se a patologias humanas, como a asma, artrite, esclerose múltipla, colites, doenças neurodegenerativas, desenvolvimento de tumores, choque séptico e rejeição a transplantes (BOGDAN, 2001; NAGY *et al.*, 2007).

A talidomida interfere na angiogênese, processo no qual o NO possui um papel importante visto sua atuação na migração de células endoteliais (LEE *et al.* 2005). Neste contexto, Tamilarasan e colaboradores (2006) mostraram que a talidomida exerce seu efeito inibitório na angiogênese mediada por óxido nítrico alterando o padrão de polimerização a nível sub-celular de actina.

Shimazawa e colaboradores (2004) mostraram pela primeira vez que a talidomida possui capacidade de inibir a atividade da óxido nítrico sintase (NOS), avaliando-se a produção de nitrito/nitrato *in vitro*. Contudo, segundo esses autores, esta atividade foi baixa. Noguchi e colaboradores (2004) demonstraram também *in vitro* que a talidomida apresenta baixa atividade inibitória para NO induzido por iNOS e que compostos contendo uma subunidade ftalimídica associados ao grupo fenil ao invés da glutarimida (fenilmonoftalimida) apresentaram elevada atividade inibitória.

Neste estudo, a talidomida apresentou baixa atividade inibitória para produção de NO avaliado no sobrenadante de células J774A.1 ativadas. Os análogos, em contrapartida, apresentaram elevada atividade inibitória em comparação ao controle estimulado. Nos compostos sem o radical NO<sub>2</sub>, a atividade inibitória foi maior no análogo **3**, não havendo relação com efeito citotóxico. Nos compostos com o radical NO<sub>2</sub>, houve uma melhora na atividade inibitória da produção de NO nos compostos **2A** e **5A**. Uneda e colaboradores (2003) mostraram que em camundongos tratados com o inibidor específico de NO sintase (NOS), N(omega)-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), suprimiu de forma significativa o crescimento do mieloma múltiplo induzido, como também a diminuição dos níveis de VEGF e redução da neovascularização. A marcante atividade inibitória para produção de NO exercida pelos compostos reforça seu potencial terapêutica no tratamento de patologias envolvendo angiogênese.

### **Produção de IL-10**

No presente estudo, a talidomida e os compostos **3**, **2A** e **5A** apresentaram elevada atividade inibitória para produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO. Entretanto, compostos **3**, **2A** e **5A** mostraram um aumento significativo da produção de IL-10 em relação ao controle estimulado. Tendo em vista que os análogos **3**, **2A** e **5A** inibiram citocinas envolvidas na resposta Th1 e inibiram a produção de NO, é possível que este efeito tenha contribuído para aumento da produção de IL-10, o que será ainda investigado. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Corral e colaboradores (1996) que mostraram que análogos monoftalimídicos fechados da talidomida inibiram a produção de TNF- $\alpha$  por células do sangue periférico humano estimuladas com LPS e aumentaram a produção de IL-10. Observaram também que, ao tratarem as culturas com anti-IL10, o efeito inibitório para produção de TNF- $\alpha$  mediado pelos análogos permaneceu inalterado, indicando que a inibição para produção de TNF- $\alpha$  não foi mediada pela produção de IL-10. Estes autores mostraram que a talidomida também estimulou a produção de IL-10 por PBMC humano. Outros trabalhos contudo, avaliando células de pulmão de camundongos infectados com *M. tuberculosis* (MOREIRA *et al.*, 1997) ou células dendríticas humanas ativadas com CD40L e cultivadas por 48 horas (MOTHY *et al.*, 2002), mostraram respectivamente uma diminuição da produção de mRNA para IL-10 e redução dos níveis de produção de IL-10 após tratamento com talidomida.

Esses dados sugerem que os compostos **3**, **2A** e **5A** tem capacidade de influenciar na ativação das células J774A.1, inibindo o perfil de citocinas pró-inflamatórias e contribuindo para um perfil regulatório mediado por IL-10.

### **5.3. Efeito dos compostos no acúmulo de mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e iNOS em células J774A.1**

#### **Produção de mRNA para TNF- $\alpha$**

Conforme descrito na literatura, um dos mecanismos de ação da talidomida consiste em desestabilizar o mRNA para TNF- $\alpha$  diminuindo sua meia-vida (MOREIRA *et al.*, 1993), o que caracteriza um evento pós-transcricional. Foi descrito

também que o tratamento com talidomida em células (PBMC) humanas estimuladas com LPS ou produtos micobacterianos resultou na diminuição do acúmulo de mRNA para TNF- $\alpha$  e IL-12 (SAMPAIO *et al.*, 2002). No presente trabalho, em culturas de células J774A.1 estimuladas por 2 horas, tanto a talidomida quanto os compostos **3**, **2A** e **5A** não influenciaram de forma significativa no acúmulo de mRNA para TNF- $\alpha$ . Contudo, em culturas de 6 horas, a talidomida e os compostos **3**, **2A** e **5A** foram capazes de diminuir o acúmulo de mRNA para TNF- $\alpha$ , indicando que um possível mecanismo de ação dos análogos envolve eventos pós-transcricionais. Esses resultados estão de acordo com os dados apresentados por Kim e colaboradores (2004), que mostraram que células humanas do epitélio intestinal (HT-29) estimuladas com LPS e cultivadas por 2 horas em presença de talidomida não apresentam alteração no acúmulo de mRNA para TNF- $\alpha$ . Entretanto, após 6 horas de cultura, a talidomida diminuiu o acúmulo de mRNA para TNF- $\alpha$ . Os autores demonstraram também que a via de atuação da talidomida foi independente da via NF- $\kappa$ B, tendo em vista os resultados de degradação do mRNA para TNF- $\alpha$  não terem sido relacionados com a inibição da ativação da via NF- $\kappa$ B avaliando-se a capacidade do NF- $\kappa$ B de se ligar ao DNA.

### **Produção de mRNA para IL-12**

Moraes e colaboradores (2000) demonstraram em biópsias de pele coletadas de pacientes com ENL tratados com talidomida uma redução do acúmulo de mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6 e também para IL-10. No presente estudo, de acordo com esses achados, foi demonstrado que a talidomida apresentou capacidade de diminuir o acúmulo de mRNA para IL-12. Moller e colaboradores (1997), em modelo de PBMC estimuladas com SAC, foram os primeiros a descrever que a talidomida interfere no acúmulo de mRNA para IL-12. Os autores, no entanto, observaram maior acúmulo de mRNA para IL-12 após 12 horas de incubação, em contraste com uma inibição da produção de IL-12p40 no sobrenadante das culturas, sugerindo que essa inibição ocorreu em parte por eventos pós-transcricionais. Um destes eventos pós-transcricionais foi demonstrado por Jin e colaboradores (2007), onde a talidomida inibiu o deslocamento citoplasmático de HuR, que está envolvido na estabilização de proteínas e da proteína MAPK-p38, que relaciona-se com a

regulação pós-transcricional da estabilidade do mRNA para COX-2. Além disso, TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e iNOS também são dependentes de MAPK-p38 (SAKLATVALA, 2004).

No presente estudo, a talidomida e os compostos **3**, **2A** e **5A** não influenciaram no acúmulo de mRNA para IL-12 em células J774A.1 cultivadas por 2 horas. Contudo, em culturas de 6 horas, a talidomida diminuiu de forma significativa o acúmulo de mRNA para IL-12, enquanto que os compostos **3**, **2A** e **5A** induziram aumento do acúmulo de IL-12 neste período. Com isso, sugere-se que o efeito dos compostos quanto à inibição de IL-12 envolva mecanismos pós-transcricionais. D'Agostino e colaboradores (2001) mostraram que tetraciclinas modificadas quimicamente aumentaram o acúmulo de mRNA para IL-12. Contudo, os mesmos autores descreveram em trabalhos anteriores o efeito de tetraciclinas modificadas em inibir a produção de IL-12 avaliado em sobrenadante de cultura sugerindo-se, desta forma, que os compostos interferem no bloqueio de eventos pós-transcricionais na produção de IL-12.

### **Produção de mRNA para iNOS**

Para a produção de mRNA para iNOS, o que se observou nesse estudo foi que em culturas de 2 horas os compostos não interferiram no acúmulo do mRNA, exceto o composto **3** que induziu diminuição. Porém, em culturas de 6 horas, tanto a talidomida quanto os compostos induziram de forma significativa o acúmulo de mRNA para iNOS. O mesmo foi observado por D'Agostino e colaboradores (2001) para a produção de mRNA de iNOS, onde tetraciclinas modificadas apresentaram capacidade de inibir a produção de NO avaliado no sobrenadante, mas promoveram um aumento no acúmulo de mRNA para iNOS, sugerindo-se que o controle seja a nível de atividade da enzima, ao invés de um controle envolvendo a expressão de mRNA para iNOS. Hinz, Brune e Pahl, (2000) observaram que em culturas de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS/IFN- $\gamma$  tratados com L-NMMA (inibidor específico da enzima envolvida na produção de NO) houve diminuição da produção de NO e aumento do acúmulo de mRNA de iNOS. Os autores sugeriram que o NO endógeno atua promovendo um *feedback* negativo capaz de limitar a extensão da indução transcricional de sua própria síntese enzimática. Logo, a remoção deste

*feedback*, inibindo-se a enzima iNOS, resultou na amplificação da expressão de mRNA para iNOS. Quando adicionaram um indutor da produção de NO por via independente de ativação enzimática, os mesmos autores observaram que o aumento da produção de NO resultou na diminuição dos níveis de mRNA para iNOS, sugerindo-se que o NO derivado da indução de iNOS atenua a transcrição do gene por via autorregulatória. Logo, no presente estudo, um possível mecanismo de atuação dos compostos para produção de NO envolve controle pós-transcricional.

### **Produção de mRNA para IL-10**

Neste estudo a talidomida diminuiu significativamente o acúmulo de mRNA para IL-10 tanto em culturas de 2 horas quanto em culturas de 6 horas. Esses resultados podem ser diretamente correlacionados com o observado nos sobrenadantes de culturas, onde ocorreu uma redução da produção de IL-10, sugerindo um controle transcricional. Contudo, quanto aos análogos, o efeito foi de aumentar o acúmulo de mRNA de IL-10, em culturas de 2 horas para os compostos **2A** e **5A**, e em culturas de 6 horas para os compostos **3**, **2A** e **5A**. Estes aumentos observados correspondem com aumento da produção de IL-10 avaliado por ELISA após 18 horas de cultura. De acordo com esses achados, outros estudos mostraram que em biópsia de tecido epitelial de pacientes com ENL e em pulmões de camundongos infectados com *M. tuberculosis*, o tratamento com talidomida resultou em redução da produção de mRNA para IL-10 (Moreira *et al.*, 1997; Moraes *et al.*, 2000). Em contraste, Rowland e colaboradores (1998) mostraram que em PBMC humano estimulado com PHA por 9 horas a talidomida não apresentou efeito significativo no acúmulo de mRNA para IL-10 bem como na produção de IL-10 avaliados no sobrenadante após 48 horas de cultura. No presente estudo, observou-se que os compostos **3**, **2A** e **5A** contribuíram de forma a diminuir a resposta inflamatória induzida por LPS/IFN- $\gamma$  e de aumentar a produção de IL-10, uma importante citocina envolvida no controle da resposta imune e com papel importante no controle de processos inflamatórios por seu efeito imunossupressor (PESTKA *et al.* 2004).

Em geral, os resultados sugerem que os compostos **3**, **2A** e **5A** exerceram potencial efeito pós-transcricional no controle da produção do mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-



12, iNOS e no controle transcricional para IL-10 e que este efeito foi dependente da dose.

#### **5.4. Efeito dos compostos na expressão das moléculas CD80 e CD86 em células J774A.1**

Quanto a expressão de moléculas co-estimulatórias, trabalhos mostram que monócitos expressam CD86 de forma constitutiva, enquanto que moléculas CD80 são induzidas após a ativação celular (HATHCOOCK, *et al.*, 1994; INABA *et al.*, 1994; INABA *et al.*, 1995). Tem sido sugerido que CD86 relaciona-se ao processo de iniciação e que CD80 possa participar nos estágios avançados da resposta imune (LU, WANG e LINSLEY, 1997). A expressão dessas moléculas pode ser aumentada devido a diversos estímulos (LARSEN, 1992). Estudos iniciais mostraram que a expressão de moléculas CD86 relaciona-se a uma resposta Th2, enquanto que a expressão de moléculas CD80 direciona uma resposta Th1 (KUCHROO *et al.*, 1995; RACKE *et al.*, 1995; RANGER *et al.*, 1996; BROWN *et al.*, 1996; KEANE-MYERS *et al.*, 1998). Além disto, CD80 se liga 2-3 vezes mais forte a CD28 e CTLA-4 expressos em células T, com baixa constante de dissociação e maior afinidade do que CD86 (MERWE e DAVIS, 2003).

Além da capacidade de influenciar na produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e NO, a talidomida e os análogos **3**, **2A** e **5A** influenciaram quanto a expressão da molécula co-estimulatória CD80, a qual é fundamental no processo de ativação de células T. Entretanto, para a expressão de CD86, o efeito inibitório foi pouco evidente. Apenas os análogos **3** e **2A** apresentaram efeito inibitório em altas concentrações. Schutt e colaboradores (2005) mostraram que indivíduos com mieloma múltiplo tratados com talidomida apresentaram uma redução da expressão da molécula CD86, além de outros marcadores de superfície relacionados a ativação de células dendríticas. LeBlanc e colaboradores (2004) mostraram que o análogo da talidomida CC-5013, o qual apresenta elevada atividade inibitória para produção de TNF- $\alpha$ , não apresentou capacidade de modular a expressão de CD80-CD86 de células dendríticas humanas imaturas ou maduras após indução com TNF- $\alpha$ . As diferenças destes resultados com o presente estudo podem ser explicadas em função das condições experimentais, onde não somente à forma de ativação, mas

também o tipo de célula alvo utilizada podem influenciar quanto a expressão de moléculas co-estimuladoras.

As vias CD40-CD40L e CD28-CD80 são importantes para ativação de células T autorreativas e ativação policlonal de células B (TOKUNAGA *et al.*, 2005). Estas vias de ativação estão elevadas em pacientes com LE sistêmico ativo (DESAI-MEHTA *et al.*, 1996; KOVACS, THOMAS e TSOKOS, 1996). Wong e colaboradores (2005) demonstraram elevada presença no plasma de moléculas solúveis (s) como sCTLA-4, sCD28, sCD80 e sCD86 e especularam sobre a produção elevada e sua possível associação com a patologia relacionada ao LE. Além disto, Denfeld e colaboradores (1997) demonstraram que células APC de lesão cutânea de indivíduos com LE sistêmico apresentaram elevada expressão de moléculas B7.

Conforme observado por Zheng e colaboradores (2004), a interação CD86-CD28 promove importante sinal que interfere com funções inibitórias de células T regulatórias (Treg), conquanto que a ligação CD80 resulta em atividade regulatória quando na interação com CTLA-4. Além disto, em trabalhos de Zheng e colaboradores (2006), mostrou-se que a ligação CD80-CTLA-4 seria necessária para TGF- $\beta$  induzir expressão de FOXP-3<sup>+</sup> e favorecer a diferenciação de células T regulatórias. Desta forma, a inibição de CD80 observada neste trabalho pode fornecer um dado a mais a respeito do mecanismo de ação da talidomida no combate a processos malignos, uma vez que tem sido observada elevada frequência de células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> na área do tumor e no sangue periférico de pacientes com tumores avançados (WOLF *et al.*, 2003; CURIEL *et al.*, 2004). Além disto, Giannopoulos e colaboradores (2008) demonstraram que pacientes com leucemia linfocitária crônica apresentaram elevada frequência de células Tregs FOXP-3<sup>+</sup> e que o tratamento com talidomida resultou em redução do número de células Tregs na população total de linfócitos. A capacidade dos compostos estudados de reduzir a expressão de CD80 pode contribuir para uma atividade moduladora da resposta Th1.

Tendo em vista os estudos relacionando os efeitos benéficos da talidomida no tratamento de doenças autoimunes, câncer e seu potencial de modular populações de linfócitos Th1 e Treg (THOMSON e GOODFIELD, 2001; HOUSMAN *et al.*, 2003; TEO, STIRLING e ZELDIS, 2005; GIANNOPOULOS *et al.*, 2008), o presente estudo sugere o potencial uso da talidomida e dos compostos **3**, **2A** e **5A** no tratamento de

desordens com resposta imune exacerbada envolvendo a produção de moléculas co-estimulatórias.

### **5.5. Efeito compostos na produção de IFN- $\gamma$ em PBMC humano e em células L1210**

Conforme se observou neste estudo, os compostos **3**, **2A** e **5A** e a talidomida apresentaram boa atividade inibitória para produção de IFN- $\gamma$  observada em culturas de PBMC humano e em culturas de células L1210 (linhagem de células leucêmicas linfóides de camundongos transformadas para produzirem IFN- $\gamma$  de forma constitutiva). A talidomida apresentou efeito inibitório significativo a 120  $\mu$ M, sendo que os compostos **3**, **2A** e **5A** tiveram uma atividade melhor em baixas concentrações, não havendo neste caso efeito citotóxico. Em contraste, estudos utilizando culturas de LT CD4+ e LT CD8+ purificadas e estimuladas com antiCD-3, mostraram que a talidomida pode exercer efeito de estimular a produção de IFN- $\gamma$  bem como a produção de IL-2 (Haslett e colaboradores 1998). Contudo, em concordância com os nossos achados, em culturas de PBMC humano estimuladas com PHA e SKSD (uma mistura das proteínas estreptocinase e estreptodornase produzidas por estreptococos hemolíticos) a talidomida mostrou capacidade de inibir a produção de IFN- $\gamma$  nas primeiras 72 horas de cultura, efeito acompanhado de aumento de IL-4 (MCHUGH *et al.*, 1995). Moraes e colaboradores (2000) também demonstraram uma redução do acúmulo de mRNA para IFN- $\gamma$  em biópsias de pele coletadas de pacientes com ENL tratados com talidomida. Nossos resultados mostram que a talidomida e os análogos selecionados apresentam potencial capacidade de inibir a produção de IFN- $\gamma$ , reforçando seu potencial papel anti-inflamatório e potencial aplicação dos compostos no tratamento de doenças como artrite reumatóide onde se observa desregulação das populações de células T e acúmulo de células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$  nas articulações (OSSANDON *et al.*, 2002; YAMADA *et al.*, 2007).

## 5.6. Efeito dos análogos da talidomida na produção de IL-6 e quimiocinas CXCL9, CXCL10 por PBMC humano

Os resultados deste trabalho mostram que os compostos **3**, **2A** e **5A** tem capacidade de inibir a produção das quimiocinas CXCL9 e CXCL10. Essas quimiocinas são induzidas por IFN- $\gamma$  em diferentes tipos de células (MOSER e LOETSCHER, 2001) e relacionam-se ao controle do tráfego de linfócitos Th1 CXCR3<sup>+</sup>, os quais apresentam importante papel na resposta imune observada na rejeição de alotransplantes e no LE (HANCOOCK *et al.*, 2001; EL-SAWY, FAHMY e FAIRCHILD., 2002; HASKOVA *et al.*, 2007; WENZEL *et al.*, 2007).

De forma interessante, a inibição da produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$  pela talidomida e os compostos estudados correlacionou com a inibição da produção de CXCL9 e CXCL10, reforçando o potencial desses compostos e da talidomida tanto na inibição da ativação de células envolvidas em respostas inflamatórias e Th1, como no recrutamento de células da imunidade inata e adquirida para o local da inflamação. Yun e colaboradores (2002), observaram que o tratamento com anti-CXCL9 atenuou a vasculopatia comumente observada em transplante alogênico de coração em camundongo, sugerindo que o bloqueio de múltiplas quimiocinas e seus receptores contribuem para o controle da rejeição crônica de transplantes. BELPERIO e colaboradores (2003) mostraram que em modelo de transplante de pulmão em ratos, o tratamento com anti-CXCL9 em associação com o imunossupressor ciclosporina A resultou em redução dos *scores* de rejeição ao transplante em relação ao controle não tratado. De acordo com o nosso conhecimento da literatura, esse é o primeiro trabalho mostrando a capacidade de inibição de CXCL9 e CXCL10 pela talidomida em células do sangue periférico estimuladas com LPS.

Finalmente, um dos efeitos descritos para talidomida que contribui para seu papel efector contra o MM é de interferir na secreção de IL-6, uma das importantes citocinas envolvidas na interação e proliferação de células do mieloma e células endoteliais da medula óssea (KLEIN *et al.*, 1995). A produção de IL-6 por células do estroma da medula óssea é marcadamente expressa no MM, permitindo a adesão de células tumorais ao estroma da medula óssea, levando ao crescimento e sobrevivência destas células (GUPTA *et al.*, 2001). Neste estudo, a talidomida apresentou significativa atividade inibitória sobre a produção de IL-6. Contudo, os

compostos selecionados tiveram uma atividade inibitória ainda maior em comparação a talidomida. Os mecanismos que regulam as atividades inibitórias dos compostos estudados neste trabalho ainda serão investigados e podem envolver: 1) inibição da ativação do NF- $\kappa$ B (KEIFER *et al.*, 2001), 2) a indução de apoptose (HIDESHIMA *et al.*, 2000), 3) eventos envolvendo inibição da produção de PDE-4 (MULLER *et al.*, 1998), 4) ligação a alfa 1-glicoproteína ácida com alta especificidade (TURK, JIANG e LIU, 1996), 4) mecanismos que envolvem a regulação de mRNA (MOREIRA *et al.*, 1993).

Em resumo, os compostos analisados mostraram potencial aplicabilidade quanto ao controle de resposta imune com perfil pró-inflamatório, através da capacidade de inibir a produção de moléculas chave neste contexto como TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-6, e NO. Além disto, mostraram capacidade de interferir na migração de células inflamatórias através da inibição da produção de CXCL9 e CXCL10. Os compostos estudados induziram aumento da produção de IL-10, reforçando seu potencial para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento de doenças inflamatórias, autoimunes e tumores.

## 6 Conclusões

**6.1** A característica dos análogos da talidomida do presente estudo de não apresentarem centro quiral confere uma vantagem quanto ao preparo desses compostos, evitando assim uma etapa de separação do racemato. Isso também contribui para reduzir a possibilidade de indução de efeitos colaterais indesejáveis.

**6.2** A subunidade ftalimídica hidrolisada possibilitou um aumento da solubilidade dos compostos em comparação ao correspondente composto com grupo ftalimídico não hidrolisado.

**6.3** Os compostos selecionados **3**, **2A** e **5A** apresentaram atividade inibitória para a produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO em culturas de J774A.1 e aumentaram a produção de IL-10, bem como inibiram a produção de IFN- $\gamma$  em culturas de células L1210.

**6.4** Os compostos **3**, **2A** e **5A** inibiram a produção de TNF- $\alpha$  (IC<sub>50</sub> 55, 5 e 6,1  $\mu$ M respectivamente) mais eficiente que a talidomida (IC<sub>50</sub> 220  $\mu$ M) em culturas de PBMC humano. Além disto, inibiram a produção de IFN- $\gamma$ , de IL-6 e CXCL9 e CXCL10, revelando potencial efeito no tratamento de desordens que envolvam resposta inflamatória exacerbada.

**6.5** Além de interferir na produção de citocinas e NO por células J774A.1 ativadas, os compostos influenciaram na expressão de CD80, mostrando importante efeito dos análogos em diminuir moléculas co-estimulatórias de ativação linfocitária.

**6.6** O potencial mecanismo de ação dos compostos relacionado a inibição da produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, iNOS observado em J774A.1 envolve, em parte, controle pós-transcricional e para produção de IL-10 é possível que os compostos influenciarem em eventos transcricionais. E os efeitos observados dependeram da concentração utilizada.

**6.7** O aumento do espaçamento entre as unidades ftalimídicos e a adição do grupo NO<sub>2</sub> resultou, em geral, em maior atividade inibitória dos compostos em relação a produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO, observados em culturas de PBMC humano e células J774A.1.

## 7 Referências

- AGOSTINI, C.; MENEGHIN, A.; SEMENZATO, G. 2002. T-lymphocytes and cytokines in sarcoidosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, **8 (5)**: 435-440.
- 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. 2007. Thalidomide analogs from diamines: synthesis and evaluation as inhibitors of TNF-alpha production. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **55(2)**: 223-226.
- ARRIETA, O.; GUEVARA, P.; TAMARIZ, J.; REMBAO, D.; RIVERA, E.; SOTELO, J. 2002. Antiproliferative effect of thalidomide alone and combined with carmustine against C6 rat glioma. **International Journal of Experimental Pathology**, **83(2)**: 99-104.
- AZUMA, Y.; MURATA, M.; MATSUMOTO, K. 2000. Alternation of sugar chains on  $\alpha$ -1-acid glycoprotein secreted following cytokine stimulation of HuH-7 cells in vitro. **Clinica Chimica Acta**, **294**: 93-103.
- BARNHILL, R.L.; DOLL, N.J.; MILLIKAN, L.E.; HASTINGS, R.C. 1984. Studies on the anti-inflammatory properties of thalidomide: effects on polymorphonuclear leukocytes and monocytes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, **11(5)**: 814-819.
- BARTLETT, J.B.; DREDGE, K.; DALGLEISH, A.G. 2004. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, **4(4)**: 314-322.
- BAUDITZ, J.; WEDEL, S.; LOCHS, H. 2002. Thalidomide reduces tumour necrosis factor alpha and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. **Gut**, **50**: 196-200.
- BAUER, K.S.; DIXON, S.C.; FIGG, W.D. 1998. Inhibition of Angiogenesis by Thalidomide requires metabolic activation, which is species-dependent. **Biochemical Pharmacology**, **55(11)**: 1827-1834.
- BELLAMY, W.T.; RICHTER, L.; FRUTIGER, Y.; GROGAN, T.M. 1999. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. **Cancer Research**, **59**: 728-733.



BEN-BARUCH, A.; MICHIEL, D.F.; OPPENHEIM, J.J. 1995. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. **Journal of Biological Chemistry**, **270**: 11703-11706.

BELPERIO, J.A.; KEANE, M.P.; BURDICK, M.D.; LYNCH, J.P. 3RD; ZISMAN, D.A.; XUE, Y.Y.; LI, K.; ARDEHALI, A.; ROSS, D.J.; STRIETER, R.M. 2003. Role of CXCL9/CXCR3 chemokine biology during pathogenesis of acute lung allograft rejection. **The Journal of Immunology**, **171(9)**: 4844-4852.

BOCHUD, P.Y.; HAWN, T.R.; SIDDIQUI, M.R.; SAUNDERSON, P.; BRITTON, S.; ABRAHAM, I.; ARGAW, A.T.; JANER, M.; ZHAO, L.P.; KAPLAN, G., and ADEREM, A. 2008. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy **The Journal of Infectious Diseases**, **197**: 253-261.

BOGDAN, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, **2**: 907-916.

BORGES, L.G.; FROEHLICH, P. 2003. Talidomida – Novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, **49(1)**: 96-102.

BOTTING, J. 2001. The history of thalidomide. **Drug News and Perspectives**, **15(9)**: 604-611.

BREN L. 2001. Frances Oldham Kelsey. FDA medical reviewer leaves her mark on history. **FDA Consumer**, **35(2)**: 24-29.

BROWN, J.A.; TITUS, R.G.; NABAVI, N.; GLIMCHER, L.H. 1996. Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by downregulating the Th2 response. **The Journal of Infectious Diseases**, **174**: 1303-1308.

CALIGARIS-CAPPIO, F.; BERGUI, L.; GREGORETTI, M.G.; GAIDANO, G.; GABOLI, M.; SCHENA, M.; ZALLONE, A.Z.; MARCHISIO, P.C. 1991. Role of bone marrow stromal cells in the growth of human multiple myeloma. **Blood**, **77**: 2688-2693.

CARVALHO, A.T.; SOUZA, H.; CARNEIRO, A.J.; BRANCO, CASTELO-M.; MADI, K.; SCHANAIDER, A.; SILV F.; JUNIOR, PEREIRA F.A.; PEREIRA, M.G.; TORTORI, C.; DINES, I.; CARVALHO, J.; ROCHA, E.; ELIA, C. 2007. Therapeutic and prophylactic thalidomide in TNBS-induced colitis: synergistic effects on TNF-alpha, IL-12 and VEGF production. **World Journal Of Gastroenterology**, **13**: 2166-2173.

CORRAL, L.G.; MULLER, G.W.; MOREIRA, A.L.; CHEN Y.; WU M.; STIRLING, D.; KAPLAN, G. 1996. Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibitory activity. **Molecular Medicine**, **2(4)**: 1076-1551.

CORRAL, L.G. e KAPLAN, G. 1999. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. **Annals of the Rheumatic Diseases**, **58**: 1107-1113.

CORRAL, L.G.; HASLETT, P.A.J.; MULLER, G.W.; CHEN, R.; WONG, L.M.; OCAMPO, C.J.; PATTERSON, R.T.; STIRLING, D.A.; KAPLAN, G. 1999. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF- $\alpha$  **The Journal of Immunology**, **163**: 380-386.

CURIEL, T.J.; COUKOS, G.; ZOU, L.; ALVAREZ, X.; CHENG, P.; MOTTRAM, P.; EVDEMON-HOGAN, M.; CONEJO-GARCIA, J.R.; ZHANG, L.; BUROW, M.; ZHU, Y.; WEI, S.; KRYCZEK, I.; DANIEL, B.; GORDON, A.; MYERS, L.; LACKNER, A.; DISIS, M.L.; KNUTSON, K.L.; CHEN, L.; ZOU, W. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nature Medicine**, **10**: 942-949.

D'AGOSTINO, P.; FERLAZZO, V.; MILANO, S.; ROSA M.L.; BELLA, G.D.; CARUSO, R.; BARBERA, C.; GRIMAUDO, S.; TOLOMEO, M.; FEO, S.; CILLARI, E. 2001. Anti-inflammatory effects of chemically modified tetracyclines by the inhibition of nitric oxide and interleukin-12 synthesis in J774 cell line. **International Immunopharmacology**, **1**: 1765-1776.

D'AMATO, R.J.; LOUGHNAN, M.S.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J. 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (US)**, **91(9)**: 4082-4085.

DENFELD, R.W.; KIND, P.; SONTHEIMER, R.D.; SCHOP, F.E.; SIMON, J.C. 1997. In situ expression of B7 and CD28 receptor families in skin lesions of patients with lupus erythematosus. **Arthritis and rheumatism**, **40**: 814-821.

DESAI-MEHTA, A.; LU, L.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; DATTA, S.K. 1996. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. **The Journal of Clinical Investigation**, **97**: 2063-2073.

DUDZINSKI, D.M.; IGARASHI, J.; GREIF, D.; MICHEL, T. 2006. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, **46**: 235-276.

DUNZENDORFER, S.; SCHRATZBERGER, P.; REINISCH, N.; KAHLER, C.M.; WIEDERMANN, C.J. 1997. Effects of thalidomide on neutrophil respiratory burst, chemotaxis, and transmigration of cytokine- and endotoxin-activated endothelium. *Naunyn Schmiedeberg's Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **356**: 529-535.

DUNZENDORFER, S.; HEROLD, M.; WIEDERMANN, C.J. 1999. Inducer-specific bidirectional regulation of endothelial interleukin-8 production by thalidomide. *Immunopharmacology*, **43**: 4359-4364.

D MOSZYNSKA, A.; PODHORECKA, M.; MANKO, J.; JUNAK, BOJARSKA-A.; ROLINSKI, J.; SKOMRA, D. 2005. The influence of thalidomide therapy on cytokine secretion, immunophenotype, BCL-2 expression and microvessel density in patients with resistant or relapsed multiple myeloma. *Neoplasma*, **52**: 175-181.

DREDGE, K.; DALGLEISH, A.G; MARRIOTT, J.B. 2003. Thalidomide analogs as emerging anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs*, **14**: 331-335.

DRUCKER, L.; UZIEL, O.; TOHAMI, T.; SHAPIRO, H.; RADNAY, J.; YARKONI, S.; LAHAV, M.; LISHNER, M. 2003. Thalidomide down-regulates transcript levels of GC-rich promoter genes in multiple myeloma. *Molecular Pharmacology*, **64**: 415-420.

EDWARDS, M.L.; PRAKASH, N.L.; STEMERICK D.M.; SUNKARA, S.P.; BITONTI A.J. ; DAVIS, G.F.; DUMONT, J.A.; BEY, P.J. 1990. Polyamine analogs with antitumor activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **33**: 1369-1375.

EL-SAWY, T.; FAHMY, N.M.; FAIRCHILD, R.L. 2002. Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. *Current Opinion in Immunology*, **14**: 562-568.

ERIKSSON, T.; BJORKMAN, S.; HOGLUND, P. 2000. Intravenous formulations of the enantiomers of thalidomide: pharmacokinetic and initial pharmacodynamic characterization in man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **52**: 807-817.

ESKI, M.; SAHIN, I.; SENGEZER, M.; SERDAR, M.; IFRAN, A. 2008. Thalidomide decreases the plasma levels of IL-1 and TNF following burn injury: Is it a new drug for modulation of systemic inflammatory response. *Burns*, **34(1)**: 104-108.

FABRO, S.; SMITH, R.; WILLIAMS, R. 1967. Toxicity and teratogenicity of optical isomers of thalidomide. *Nature*, **215**: 296.

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

FOLKMAN, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**, **285**: 1182-1186.

FUJITA, J.; MESTRE, J.R.; ZELDIS, J.B.; SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A.J. 2001. Thalidomide and its analogues inhibit lipopolysaccharide mediated induction of cyclooxygenase-2. **Clinical Cancer Research**, **7**: 3349-3355.

GEITZ, H.; HANDT, S.; ZWINGENBERGER, K. 1996. Thalidomide selectively modulates the density of cell surface molecules involved in the adhesion cascade. **Immunopharmacology**, **31**: 213-221.

GIANNOPOULOS, K.;SCHMITT M.; WLASIUK, P.; CHEN, J.; BOJARSKA-JUNAK, A.; KOWAL, M.; ROLINSKI J.; DMOSZYNSKA, A. 2008. The high frequency of T regulatory cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia is diminished through treatment with thalidomide. **Leukemia**, **22**: 222-224.

GIEMBYCZ, M.A. 2002. Development status of second generation PDE4 inhibitors for asthma and COPD: the story so far. **Monaldi Archives of Chest Disease**, **57**: 48-64.

GOCKEL, H.R.; LUGERING, A.; HEIDEMANN, J.; SCHMIDT, M.; DOMSCHKE, W.; KUCHARZIK, T.; LUGERING, N. 2004. Thalidomide induces apoptosis in human monocytes by using a cytochrome c-dependent pathway. **The Journal of Immunology**, **172**: 5103-5109.

GUPTA, D.; TREON, S.P.; SHIMA, Y.; HIDESHIMA, T.; PODAR, K.; TAI, Y.T.; LIN, B.; LENTZSCH, S.; DAVIES, F.E.; CHAUHAN, D.; SCHLOSSMAN, R.L.; RICHARDSON, P.; RALPH, P.; WU, L.; PAYVANDF, I.; MULLER, G.; STIRLING, D.I.; ANDERSON, K.C. 2001. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. **Leukemia**, **15**: 1950-1961.

HAHN, W.C.; COUNTER, C.M.; LUNDBERG, A.S.; BIJEERSBERGEN, R.L.; BROOKS, M.W.; WEINBERG, R.A. 1999. Creation of human tumor cells with defined genetic elements. **Nature (London)**, **400**: 464-468.

HAMURYUDAN, V.; MAT, C.; SAIP, S.; OZYAZGAN, Y.; SIVA, A.; YURDAKUL, S.; ZWINGENBERGER, K.; YAZICI, H. 1998. Thalidomide in the treatment of the mucocutaneous lesions of the Behcet syndrome. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Annals of Internal Medicine**, **128(6)**: 443-450.

HANCOCK, W.W.; GAO, W.; CSIZMADIA, V.; FAIA, K.L.; SHEMMERI, N.; LUSTER, A.D. 2001. Donor-derived IP-10 initiates development of acute allograft rejection. **The Journal of Experimental Medicine**, **193**: 975-980.

HASHIMOTO Y. 1998. Novel biological response modifiers derived from thalidomide. **Current Medicinal Chemistry**, **5(3)**: 163-178.

HASKOVA, Z.; IZAWA, A.; CONTRERAS, A.G.; FLYNN, E.; BOULDAY, G.; BRISCOE, D.M. 2007. Organ-specific differences in the function of MCP-1 and CXCR3 during cardiac and skin allograft rejection. **Transplantation**, **83**: 1595-1601.

HASLETT, P.A.J.; CORRAL, L.G.; ALBERT, M.; KAPLAN, G. 1998. Thalidomide Costimulates Primary Human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8 subset. **The Journal of Experimental Medicine**, **187(11)**: 1885-1892.

HASLETT, P.A.; KLAUSNER, J.D.; MAKONKAWKEYOON, S.; MOREIRA, A.; METATRATIP, P.; BOYLE, B.; KUNACHIWA, W.; MANEEKARN, N.; VONGCHAN, P.; CORRAL, L.G.; ELBEIK, T.; SHEN, Z.; KAPLAN, G. 1999. Thalidomide stimulates T cell responses and interleukin 12 production in HIV-infected patients. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **15**: 1169-1179.

HASLETT, P.A.J.; HANEKOM, W.A.; MULLER, G.; KAPLAN, G. 2003. Thalidomide and a thalidomide analogue drug costimulate virus-specific CD8+ T cells *in vitro*. **The Journal of Infectious Diseases**, **187**: 946-955.

HASLETT, P.A.; ROCHE, P.; BUTLIN, C.R.; MACDONALD, M.; SHRESTHA, N.; MANANDHAR, R.; LEMASTER, J.; HAWKSWORTH, R.; SHAH, M.; LUBINSKY, A.S.; ALBERT, M.; WORLEY, J.; KAPLAN, G. 2005. Effective treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide is associated with immune stimulation. **The Journal of Infectious Diseases**, **192**: 2045-2053.

HATA, M.; SUGISAKI, K.; MIYAZAKI, E.; KUMAMOTO, T.; TSUDA, T. 2007. Circulating IL-12 p40 is increased in the patients with sarcoidosis, correlation with clinical markers. **Internal Medicine**, **46(17)**: 1387-1393

HATHCOCK, K.S.; LASZLO, G.; PUCILLO, C.; LINSLEY, P.; HODES, R.J. 1994. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. **The Journal of Experimental Medicine**, **180**: 631-640.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. 2004. Signaling to NF- $\kappa$ B. **Genes & Development**, **18**: 2195-2224.

HIDESHIMA, T.; CHAUHAN, D.; SHIMA, Y.; RAJE, N.; DAVIES, F.E.; TAI, Y.T.; TREON, S.P.; LIN, B.; SCHLOSSMAN, R.L.; RICHARDSON, P.; MULLER, G.; STIRLING, D.I.; ANDERSON, K.C. 2000. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. **Blood**, **96**: 2943-2950.

HINZ, B.; BRUNE, K.; PAHL, A. 2000. Nitric oxide inhibits inducible nitric oxide synthase mRNA expression in RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **271**: 353-357.

HOUSMAN, T.S.; JORIZZO, J.L.; MCCARTY, M.A.; GRUMMER, S.E.; FLEISCHER, A.B. JR; SUTEJ, P.G. 2003. Low-dose thalidomide therapy for refractory cutaneous lesions of lupus erythematosus. **Archives of Dermatology**, **139**: 50-54.

HUANG, Y.T.; HSU, C.W.; CHIU, T.H. 2008. Thalidomide and its analogs as anticancer agents. **Tzu Chi Medical Journal**, **20(3)**: 188-195.

INABA, K.; INABA, M.; WITMER-PACK, M.; HATHCOCK, K.; HODES, R.; STEINMAN, R.M. 1995. Expression of B7 costimulator molecules on mouse dendritic cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **378**: 65-70.

INABA, K.; WITMER-PACK, M.; INABA, M.; HATHCOCK, K.S.; SAKUTA, H.; AZUMA, M.; YAGITA, H.; OKUMURA, K.; LINSLEY, P.S.; IKEHARA, S.; MURAMATSU, S.; HODES, R.J.; STEINMAN, R.M. 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation *in vitro*. **The Journal of Experimental Medicine**, **180**: 1849-1860.

JACOBSON, J.M.; GREENSPAN, J.S.; SPRITZLER, J.; KETTER, N.; FAHEY, J.L.; JACKSON, J.B.; Fox, L.; Chernoff, M.; Wu, A.W.; MacPhail, L.A.; Vasquez, G.J.; Wohl, D.A. 1997. Thalidomide for the treatment of oral aphthous ulcers in patients with human immunodeficiency virus infection. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group. **The New England Journal of Medicine**, **336**: 1487-1493.

JAYAKUMAR, A.; WIDENMAIER, R.; MA, X.; MCDOWELL, M.A. 2008. Transcriptional inhibition of interleukin-12 promoter activity in *Leishmania* spp.-infected macrophages. **Journal for Parasitology**, **94(1)**: 84-93.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. 2007. *Imunobiologia. O sistema immune na saúde e na doença*. 6° Edição. Artmed. Porto Alegre.

JIN, S.H.; KIM, T.I.; YANG, K.M.; KIM, W.H. 2007. Thalidomide destabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase and cytoplasmic shuttling of Hur. **European Journal of Pharmacology**, **558**: 14-20.

KARIM, M.Y.; RUIZ-IRASTORZA, G.; KHAMASHTA, M.A.; HUGHES, G.R.V. 2001. Update on therapy—thalidomide in the treatment of lupus. **Lupus**, **10**: 188-192.

KEANE-MYERS, A.M.; GAUSE, W.C.; FINKELMAN, F.D.; XHOU, X.D.; WILLS-KARP, M. 1998. Development of murine allergic asthma is dependent upon B7-2 costimulation. **The Journal of Immunology**, **160**: 1036-43.

KEIFER, J. A.; GUTTRIDGE, D. C.; ASHBURNER, B. P.; BALDWIN A. B. 2001. Inhibition of NF- $\kappa$ B activity by thalidomide through suppression of I $\kappa$ B kinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, **276(25)**: 22382-22387.

KELSEY, F. O. 1965. Problems raised for the FDA by the occurrence of thalidomide embryopathy in Germany, 1960-1961. 1965 **American Journal of Public Health and the Nation's Health**, **55**: 703-707.

KELSEY, F. O. 1967. Events after thalidomide. **Journal of Dental Research**, **46**: 1201-1205.

KELSEY, F. O. 1988. Thalidomide update: regulatory aspects. **Teratology**, **16**: 221-225.

KENYON, B.M.; BROWNE, F.; D'AMATO, R. J. 1997. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. **Experimental Eye Research**, **64**: 971-978.

KIM, Y.S.; KIM, J.S.; JUNG, H.C.; SONG, I.S. 2004. The effects of thalidomide on the stimulation of NF- $\kappa$ B activity and TNF- $\alpha$  production by lipopolysaccharide in a human colonic epithelial cell line. **Molecules and Cells**, **17(2)**: 210-216.

KLAUSNER, J.D.; MAKONKAWKEYOON, S.; AKARASEWI, P.; NAKATA, K.; KASINRERK, W.; CORRAL, L.; DEWAR, R.L.; LANE, H.C.; FREEDMAN, V.H.; KAPLAN, G. 1996. The effect of thalidomide on the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 and M. tuberculosis infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes And Human Retrovirology**, **11**: 247-257.

KLEIN, B.; ZHANG, X.G.; LU, Z.Y.; BATAILLE, R. 1995. Interleukin-6 in human multiple myeloma. **Blood**, **85**: 863-872.

KOMOROWSKI, J.; JERCZYNSKA, H.; SIEJKA, A.; BARANSKA, P.; LAWNICKA, H.; PAWLOWSKA, Z.; STEPIEN, H. 2006. Effect of thalidomide affecting VEGF secretion, cell migration, adhesion and capillary tube formation of human endothelial EA.hy 926 cells. **Life Sciences**, **78(22)**: 2558-2563.

KOVACS, B.; THOMAS, D.E.; TSOKOS, G.C. 1996. Elevated in vivo expression of the costimulatory molecule B7-BB1 (CD80) on antigen presenting cells from a patient with SLE. **Clinical and Experimental Rheumatology**, **14**: 695-697.

KUCHROO, V.K.; DAS, M.P.; BROWN, J.A.; RANGER, A.M.; ZAMVIL, S.S.; SOBEL, R.A.; WEINER, H.L.; NABAVI, N.; GLIMCHER, L.H. 1995. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. **Cell**, **80**: 707-718.

KUMAR, S.; WITZIG, T.E.; RAJKUMAR, S.V. 2002. Thalidomide as an anti-cancer agent. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, **6(2)**: 160-174.

KUMAR, S.; WITZIG, T.E.; RAJKUMAR, S.V. 2004. Thalidomide: Current role in the treatment of non-plasma cell malignancies. **Journal of Clinical Oncology**, **22**: 2477-2488.

KUNZ, W.; KELLER, H.; MUCKTER, H. 1956. N-phthalyl-glutamic acid imide; experimental studies on a new synthetic product with sedative properties. **Arzneimittelforschung**, **6**: 426-30.

LADETTO, M.; VALLET, S.; TROJAN, A.; DELL'AQUILA, M.; MONITILLO, L.; ROSATO, R.; SANTO, L.; DRANDI, D.; BERTOLA, A.; FALCO, P.; CAVALLO, F.; RICCA, I.; DE MARCO, F.; MANTOAN, B.; BODE-LESNIEWSKA, B.; PAGLIANO, G.; FRANCESE, R.; ROCCI, A.; ASTOLFI, M.; COMPAGNO, M.; MARIANI, S.; GODIO, L.; MARINO, L.; RUGGERI, M.; OMEDE, P.; PALUMBO, A.; BOCCADORO, M. 2005. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is frequently expressed in multiple myeloma and is an independent predictor of poor outcome. **Blood**, **105**: 4784-4791.



LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, **2(10)**: 787-795.

LARSEN, C.P.; RITCHIE, S.C.; PEARSON, T.C.; LINSLEY, P.S.; LOWRY, R.P. 1992. Functional expression of the co-stimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell population. **The Journal of Experimental Medicine**, **176**: 1215-1220.

LEBLANC, R.; HIDESHIMA, T.; CATLEY, L. P.; SHRINGARPURE, R.; BURGER, R.; MITSIADES, N.; MITSIADES, C.; CHEEMA, P.; CHAUHAN, D.; RICHARDSON, P.G., ANDERSON, K.C.; MUNSHI, N. C. 2004. Immunomodulatory drug costimulates T cells via the B7-CD28 pathway. **Blood**, **103**: 1787-1790.

LEE, J.S.; DECKER, N.K.; CHATTERJEE, S.; YAO, J.; FRIEDMAN, S.; SHAH, V. 2005. Mechanisms of nitric oxide interplay with Rho GTPase family members in modulation of actin membrane dynamics in pericytes and fibroblasts. **American Journal of Pathology**, **166**: 1861-1870.

LENZ, W. 1962. Thalidomide and congenital abnormalities. **Journal of the American Medical Association**, **279**: 45-46.

LIAN J.B.; SHALHOUB V.; ASLAM F.; FRENKEL B.; GREEN J.; HAMRAH M.; STEIN G.S.; STEIN J.L. 1997. Species-specific glucocorticoid and 1, 25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression. **Endocrinology**, **138**: 2117-2127.

LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. 2001. O Renascimento de um fármaco: talidomida. **Química Nova**, **24(5)**: 683-688.

LOKENS GARD, J.R.; HU, S.; VAN FENEMA E.M.; SHENG, W.S.; PETERSON, P.K. 2000. Effect of thalidomide on chemokine production by human microglia. **The Journal of Infectious Diseases**, **7**: 983-987.

LU, P.; WANG, Y.L.; LINSLEY, P.S. 1997. Regulation of self-tolerance by CD80/CD86 interactions. **Current Opinion in Immunology**, **9**: 858-862.

MACHADO, A.L.; LIMA, L.M.; ARAUJO-JR, J.X.; FRAGA, C.A.M.; KOATZ, V.L.G.; BARREIRO, E. J. 2005. Design, synthesis and antiinflammatory activity of novel phthalimide derivatives, structurally related to thalidomide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **15**: 1169-1172.

MAJUMDAR, S.; LAMOTHE, B.; AGGARWAL, B.B. 2002. Thalidomide suppresses NF- $\kappa$ B activation induced by TNF and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. **The Journal of Immunology**, **168**: 2644-2651.

MALAZDREWICH, C.; THUMBİKAT, P.; ABRAHAMSEN, M.S.; MAHESWARAN, S.K. 2004. Pharmacological inhibition of Mannheimia haemolytica lipopolysaccharide and leukotoxin-induced cytokine expression in bovine alveolar macrophages. **Microbial Pathogenesis**, **36**: 159-169.

MALLEO, G.; MAZZON, E.; GENOVESE, T.; PAOLA, D.I.R.; MUIA, C.; CRISAFULLI, C.; SIRIWARDENA, A.K.; CUZZOCREA, S. 2007. Effects of thalidomide in a mouse model of cerulean-induced acute pancreatitis. **Shock**, **29(1)**: 89-97.

MANNON, P.J.; FUSS, I.J.; MAYER, L.; ELSON, C.O.; SANDBORN, W.J.; PRESENT, D.; DOLIN, B.; GOODMAN, N.; GRODEN, C.; HORNUNG, R.L.; QUEZADO, M.; YANG, Z.; NEURATH, M.F.; SALFELD, J.; VELDMAN, G.M.; SCHWERTSCHLAG, U.; STROBER, W. 2004. Anti-IL-12 Crohn's disease study group. anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. **The New England Journal of Medicine**, **351(20)**: 2069-2079.

MARFAING-KOKA, A.; DEVERGNE, O.; GORGONE, G.; PORTIER, A.; SCHALL, T. J.; GALANAUD, P.; EMILIE, D. 1995. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN- $\gamma$  plus TNF- $\alpha$  and inhibition by IL-4 and IL-13. **The Journal of Immunology**, **155**: 1870-1878.

MARRIOTT, J.B.; WESTBY, M.; COOKSON, S.; GUCKIAN, M.; GOODBOURN, S.; MULLER, G.; SHIRE, M.G.; STIRLING, D.; DALGLEISH, A.G. 1998. CC-3052: a water-soluble analog of thalidomide and potent inhibitor of activation-induced TNF- $\alpha$  production. **The Journal of Immunology**, **161**: 4236-4243.

MARRIOTT, J.B.; MULLER, G.; STIRLING, D.; DALGLEISH, A.G. 2001. Immunotherapeutic and antitumour potential of thalidomide analogues. **Expert Opinion on Biological Therapy**, **1(4)**: 675-682.

MCBRIDE, W. G. 1961. Thalidomide and congenital abnormalities. **Lancet**, **2**: 1358.

MCHUGH, S.M.; RIFKIN, R.; DEIGHTON, J.; WILSON, A.B.; LACHMANN, P.J.; LOCKWOOD, C.M.; EWAN, P.W. 1995. The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. **Clinical & Experimental Immunology**, **99**: 160-167.

MELCHERT, M.; LIST, A. 2007. The thalidomide saga. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, **39**: 1489-1499.

MERWE, P.A.V.D.; DAVIS, S.J. 2003. Molecular interactions mediating t cell antigen recognition. **Annual Review of Immunology**, **21**: 659-684.

MITSIADES, N.; MITSIADES, C.S.; POULAKI, V.; CHAUHAN, D.; RICHARDSON, P.G.; HIDESHIMA, T.; MUNSHI, N.C.; TREON, S.P.; ANDERSON, K.C. 2002. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. **Blood**, **99**: 4525-4530.

MIYACHI, H.; AZUMA, A.; OGASAWARA, A.; UCHIMURA, E.; WATANABE, N.; KOBAYASHI, Y.; KATO, F.; KATO, M.; HASHIMOTO, Y. 1997. Novel biological response modifiers: phthalimides with tumor necrosis factor- $\alpha$  production-regulating activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, **40**: 2858-2865.

MOEHLER, T.M.; HILLENGASS, J.; GLASMACHER, A.; GOLDSCHMIDT, H. 2006. Thalidomide in multiple myeloma. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, **7**: 431-440.

MOLLER, D.R.; WYSOCKA, M.; GREENLEE, B.M.; MA, X.; WAHL, L.; FLOCKHART, D.A.; TRINCHIERI, G.; KARP, C.L. 1997. Inhibition of IL-12 production by thalidomide. **The Journal of Immunology**, **159(10)**: 5157-5161.

MONTANA, J.G.; BUCKLEY, G.M.; COOPER, N.; DYKE, H.J.; GOWERS, L.; GREGORY, J.P.; HELLEWELL, P.G.; KENDALL, H.J.; LOWE, C.; MAXEY, R.; MIOTLA, J.; NAYLOR, R.J.; RUNCIE, K.A.; TULADHAR, B.; WARNECK, J.B.H. 1998. Aryl sulfonamides as selective PDE4 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **8**: 2635-2640.

MOORE, A.R. e WILLOUGHBY, D.A. 1995. The role of cAMP regulation in controlling inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, **101**: 387-389.

MORAES, M.O.; SARNO, E.N.; TELES, R.M.; ALMEIDA, A.S.; SARAIVA, B.C.; NERY, J.A.; SAMPAIO, E.P. 2000. Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. **Journal of Investigative Dermatology**, **115(6)**:935-41.

MOREIRA, A.L.; SAMPAIO, E.P.; ZMUIDZINAS, S.A.;FRINDT, P.; SMITH, K.A.; KAPLAN, G. 1993. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor- $\alpha$  by enhancing mRNA degradation. **The Journal of Experimental Medicine**, **177**: 1675-1680.

MOREIRA, A.L.; BERKOVA, TSENOVA-L.; WANG, J.; LAOCHUMROONVORAPONG, P.; FREEMAN, S.; FREEDMAN, V.H.; KAPLAN, G. 1997. Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. **Tubercle and Lung Disease**, **78**: 47-55.

MOREIRA, A.L.; FRIEDLANDER, D.R.; SHIF, B.; KAPLAN, G.; ZAGZAG, D. 2000. Thalidomide and a thalidomide analogue inhibit endothelial cell proliferation *in vitro*. **Journal of Neuro-Oncology**, **43**: 109-114.

MORGAN E., VARRO R., SEPULVEDA H., EMBER J.A., APGAR J., WILSON J., LOWE L., CHEN R., SHIVRAJ L., AGADIR A., CAMPOS R., ERNST D., GAUR A. 2004. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clinical Immunology**, **110**: 252-266.

MOSER, B.; LOETSCHER, P. 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. **Nature Immunology**, **2**: 123-128.

MOSSMAN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, **65**: 55-63.

MOHTY, M.; STOPPA, A.M.; BLAISE, D.; ISNARDON, D.; GASTAUT, J.A.; OLIVE, D.; GAUGLER, B. 2002. Differential regulation of dendritic cell function by the immunomodulatory drug thalidomide. **Journal of Leukocyte Biology**, **72(5)**: 939-945.

MULLER, G.W.; CORRAL, L.G.; SHIRE, M.G.; WANG, H.; MOREIRA, A.; KAPLAN, G.; STIRLING, D.I. 1996. Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, **39**: 3238-3240.

MULLER, G.W.; SHIRE, M.G.; WONG, L.M.; CORRAL, L.G.; PATTERSON, R.T.; CHEN, Y.; STIRLING, D.I. 1998. Thalidomide analogs and PDE4 inhibition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **8**: 2669-2674.

MULLER, G.W.; CHEN, R.; HUANG, S.; CORRAL, L.G.; WONG, L.M.; PATTERSON, R.T.; CHEN, Y.; KAPLAN, G.; STIRLING, D.I. 1999. Amino substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF- $\alpha$  production. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **9**: 1625-1630.

NAGY, G.; CLARK, J. M.; BUZÁS E. I.; GORMAN, C. L.; COPE, A. P. 2007. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. **Immunology Letters**, **111**: 1-5.

NAKAMURA, T.; NOGUCHI, T.; KOBAYASHI, H.; MIYACHI, H.; HASHIMOTO, Y. 2006. Mono- and dihydroxylated metabolites of thalidomide: synthesis and TNF- $\alpha$  production-inhibitory activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **54(12)**: 1709-1714.

NAKAMURA, T., NOGUCHI T., MIYACHI, H. e HASHIMOTO, Y. 2007. Hydrolyzed metabolites of thalidomide: synthesis and TNF- $\alpha$  production-inhibitory activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **55(4)**: 651-654.

NIELSEN, H.; VALERIUS, N.H. 1986. Thalidomide enhances superoxide anion release from human polymorphonuclear and mononuclear leukocytes. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, **94**: 233-237.

NILSSON, P.; MEHLE, C.; REMES, K.; ROOS, G. 1994. Telomerase activity *in vivo* in human malignant hematopoietic cells. **Oncogene**, **9**: 3034-3038.

NOGUCHI, T.; SHIMAZAWA, R.; NAGASAWA, K.; HASHIMOTO, Y. 2002. Thalidomide and its analogues as cyclooxygenase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **12**: 1043-1046.

NOGUCHI, T.; SANO, H.; SHIMAZAWA, R.; TANATANI, A.; MIYACHI, H.; HASHIMOTO, Y. 2004. Phenylhomophthalimide-type NOS inhibitors derived from thalidomide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **14**: 4141-4145.

FUJIMOTO, H.; NOGUCHI, T.; KOBAYASHI, H.; MIYACHI, H.; HASHIMOTO, Y. 2006. Effects of immunomodulatory derivatives of thalidomide (IMiDs) and their analogs on cell-differentiation, cyclooxygenase activity and angiogenesis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, **54(6)**: 855-860.

OLMO, E.D.; PLAZA, A.; MURO, A.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A.R.; NOGAL-RUIZ, J.J.; LOPEZ-PEREZ, J.L.; SAN FELICIANO, A. 2006. Synthesis and evaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **16**: 6091-6095.

OSSANDON, A.; CASSARA, E.A.M.; PRIORI, R.; VALESINI, G. 2002. Thalidomide: focus on its employment in rheumatologic diseases. **Clinical and Experimental Rheumatology**, **20**: 709-718.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. 2007. Nitric Oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, **87**: 315-424.

PARAVAR, T.; LEE, D.J. 2008. Thalidomide: mechanisms of action. **International Reviews of Immunology**, **27**: 111-135.

PARKER, P.M.; CHAO, N.; NADEMANEE, A.; O'DONNELL, M.R.; SCHMIDT, G.M.; SYNDER, D.S.; STEIN, A.S.; SMITH, E.P.; MOLINA, A.; STEPAN, D.E.; KASHYAP, A.; PLANAS, I.; SPIELBERGER, R.; SOMLO, G.; MARGOLIN, K.; ZWINGENBERGER, K.; WILSMAN, K.; NEGRIN, R.S.; LONG, G.D.; NILAND, J.C.; BLUME, K.G.; FORMAN, S.J. 1995. Thalidomide as salvage therapy for chronic graft-versus-host disease. **Blood**, **86**: 3604-3609.

PAYVANDI, F.; WU, L.; HALEY, M.; SCHAFFER, P.H.; ZHANG, L.H.; CHEN, R.S.; MULLER, G.W.; STIRLING, D.I. 2004. Immunomodulatory drugs inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF-alpha, IL-1beta, and LPS-stimulated human PBMC in a partially IL-10-dependent manner. **Cellular Immunology**, **230**: 81-88.

PEARSON, J.M.; VEDAGIRI, M. 1969. Treatment of moderately severe erythema nodosum leprosum with thalidomide - a double-blind controlled trial. **Leprosy Review**, **40(2)**: 111-116.

PEGG, A. E. 1988. Polyamine Metabolism and Its Importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. **Cancer Research**, **48**: 759-774.

PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; SARKAR, D.; WALTER, M.R.; SHI, Y.; FISHER, P.B. 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, **22**: 929-979.

PETREK, M.; KOLEK, V.; SZOTKOWSKA, J.; DU BOIS, R.M. 2002. CC and C chemokine expression in pulmonary sarcoidosis. **European Respiratory Journal**, **20**: 1206-1212.

RACKE, M.K.; SCOTT, D.E.; QUIGLEY, L.; GRAY, G.S.; ABE, R.; JUNE, C.H.; PERRIN, P.J. 1995. Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Clinical Investigation**, **96**: 2195-2203.

- RAMSARANSING, G.S.; TEELKEN, A.; ARUTJUNYAN, A.V.; DE KEYSER, J. 2004. Peripheral blood leukocyte NO production in MS patients with a benign vs progressive course. **Neurology**, **62**: 239-242.
- RANDALL, T. 1990. Thalidomide has 37-year history. **Journal of the American Medical Association**, **263**: 1474.
- RANGER, A.M.; DAS, M.P.; KUCHROO, V.K.; GLIMCHER, L.H. 1996. B7-2 (CD86) is essential for the development of IL-4-producing T cells. **International Immunology**, **8**: 1549-1560.
- RICHARDSON, P.; ANDERSON, K. 2004. Immunomodulatory analogs of thalidomide: an emerging new therapy in myeloma. **Journal of Clinical Oncology**, **22(16)**: 3212-3214
- ROWLAND, T.L.; MCHUGH, S.M.; DEIGHTON, J., DEARMAN, R.J.; EWAN, P.W.; KIMBER, I. 1998. Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunopharmacology**, **40**: 11–20.
- SAMPAIO, E.P.; SARNO, E.N.; GALILLY, R.; COHN, Z.A.; KAPLAN, G. 1991. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, **173**: 699-703.
- SAMPAIO, E.P.; MOREIRA, A.L.; SARNO, E.N.; MALTA, A.M.; KAPLAN, G. 1992. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. **The Journal of Experimental Medicine**, **175**: 1729-1737.
- SAMPAIO, E.P.; KAPLAN, G.; MIRANDA, A.; NERY, J.A.; MIGUEL, C.P.; VIANA, S.M.; SARNO, E.N. 1993. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. **The Journal of Infectious Diseases**, **168(2)**: 408-414.
- SAMPAIO, E.P.; HERNANDEZ, M.O.; CARVALHO, D.S.; SARNO, E.N. 2002. Management of erythema nodosum leprosum by thalidomide: thalidomide analogues inhibit M. leprae-induced TNF alpha production *in vitro*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **56(1)**: 13-19.

SAMPAIO, E.P.; CARVALHO, D.S.; NERY, J.A.C.; LOPES, U.G.; SARNO, E.N. 2006. Thalidomide: an overview of its pharmacological mechanisms of action. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, **5**: 71-77.

SAKLATVALA, J. 2004. The p38 Map kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. **Current Opinion in Pharmacology**, **4**: 372-377.

SETA, N.; TISSO, T B.; FORESTIER, F.; FEGER, J.; DAFFOS, F.; DURAND, G. 1991. Changes in alpha 1-acid glycoprotein serum concentration and glycoforms in the developing human fetus. **Clinica Chimica Acta**, **203**: 167-176.

SCHALL, T.J.; BACON, K.; TOY, K.J.; OEDDEL, D.V. 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. **Nature**, **347**: 669-671.

SCHEY, S.A.; FIELDS, P.; BARTELETT, J.B.; CLARKE, I.A.; ASHAN, G.; KNIGHT, R.D.; STREETLY, M.; DALGLEISH, A.G. 2004. Phase I study of an immunomodulatory analog, CC-4047, in relapsed or refractory multiple myeloma. **Journal of Clinical Oncology**, **22**: 3269-3276.

SCHUMACHER, H.; SMITH, R. L.; WILLIAMS, R. T. 1965. The metabolism of thalidomide: the spontaneous hydrolysis of thalidomide in solution. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, **25(2)**: 324-337.

SCHUMACHER, H., BLAKE, D.A.; GILLETTE, J.R. 1968. Disposition of thalidomide in rabbits and rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **160(1)**: 201-211.

SCHUTT, P.; BUTTKEREIT, U.; BRANDHORST, D.; LINDEMANN, M.; SCHMIEDL, S.; GROSSE-WILDE, H.; SEEGER, S.; NOWROUSIAN, M.R.; OPALKA, B.; MORITZ, T. 2005. *In vitro* dendritic cell generation and lymphocyte subsets in mieloma patients: influence of thalidomide and high-dose chemotherapy treatment. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, **54**: 506-512.

SHANNON, E.J.; EJIGU, M.; HAILE-MARIAM, H.S.; BERHAN, T.Y.; TASESSE, G. 1992. Thalidomide's effectiveness in erythema nodosum leprosum is associated with a decrease in CD4+ cells in the peripheral blood. **Leprosy Review**, **63**: 5-11.

SHEKIN, J. 1965. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, **6**: 303-306.



SHIGEYAMA, K.; SHIJUBO, N.; OHMACHI, M. TAKAHASHI, R.; KON, S.; OKAMURA, H.; KURIMOTO, M.; HIRAGA, Y.; TATSUNO, T.; ABE, S.; SATO, N. 2001. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN- $\gamma$  production in sarcoid lungs. **The Journal of Immunology**, **166**: 642-649.

SHIMAZAWA, R.; SANO, H.; TANATANI, A.; MIYAMACHI, H.; HASHIMOTO, Y. 2004. Thalidomide as a nitric oxide synthase inhibitor and its structural development. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **52(4)**: 498-499.

SINGHAL, S.; MEHTA, J.; DESIKAN, R.; AYERS, D.; ROBERSON, P. 1999. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. **The New England Journal of Medicine**, **341**: 1565-1571.

SLEIJFER, S.; KRUIT, W.H.J.; STOTER, G. 2004. Thalidomide in solid tumours: the resurrection of an old drug. **European Journal of Cancer**, **40**: 2377-2382.

SOUNESS, J.E., ALDOUS, D., SARGENT, C. 2000. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. **Immunopharmacology**, **47**: 127-162.

STEPHENS T.D.; BUNDE, C.J. W.; FILLMORE, B.J. 2000. Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. **Biochemical Pharmacology**, **59**: 1489-1499.

TAMILARASAN, K.P.; KOLLURU, G.P.; RAJARAM, M.; INDHUMATHY, M.; CHATTERJEE, R.S.S. 2006. Thalidomide attenuates nitric oxide mediated angiogenesis by blocking migration of endothelial cells. **BMC Cell Biology**, **7**: 17.

TAVARES, J.L.; WANGOO, A.; DILWORTH, P.; MARSHALL, B.; KOTECHA, S.; SHAW, R.J. 1997. Thalidomide reduces tumour necrosis factor-alpha production by human alveolar macrophages. **Respiratory Medicine**, **91**: 31-39.

TEO, S.K.; RESZTAKA, K.E.; SCHEFFLER, M.A.; KOOKB, K.A.; ZELDISA, J.B.; STIRLINGA, D.I.; THOMAS, S.D. 2002. Thalidomide in the treatment of leprosy. **Microbiology and Infection**, **4(11)**: 1193-1202.

TEO, S.K.; COLBURN WAYNE, A.; TRACEWELL, W.G.; KOOK, K.A.; STIRLING, D. I.; JAWORSKY, M.S.; SCHEFFLER, M.A.; THOMAS, S.D.; LASKIN, O.L. 2004. Clinical pharmacokinetics of thalidomide. **Clinical Pharmacokinetics**, **43(5)**: 311-327.

TEO, S.K.; STIRLING, D.I.; ZELDIS, J.B. 2005. Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product. **Drug Discovery Today**, **10(2)**: 107-114.

FOURNIER, T., MEDJOUBI-N, N., PORQUET, D. 2000. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1482**: 157-171.

THOMSON, K.F.; GOODFIELD, M.J. 2001. Low-dose thalidomide is an effective second-line treatment in cutaneous lupus erythematosus. **Journal of Dermatological Treatment**, **12**: 145-147.

TOKUNAGA, M.; FUJII, K.; SAITO, K.; NAKAYAMADA, S.; TSUJIMURA, S.; NAWATA, M.; TANAKA, Y. 2005. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. **Rheumatology (Oxford)**, **44**: 176-182.

TRAMONTANA, J.M.; UTAIPAT, U.; MOLLOY, A.; AKARASEWI, P.; BURROUGHS, M.; MAKONKAWKEYOON, S.; JOHNSON, B.; KLAUSNER, J.D.; ROM, W.; KAPLAN, G. 1995. Thalidomide treatment reduces tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis. **Molecular Medicine**, **1**: 384-397.

TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate and antigen-specific adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, **13**: 251-276.

TURK, B.E.; JIANG, H.; LIU, J. O. 1996. Binding of thalidomide to alpha1-acid glycoprotein may be involved in its inhibition of tumor necrosis factor alpha production. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, **93(15)**: 7552-7556.

UNEDA, S.; HATA, H.; MATSUNO, F.; NAGASAKI, A.; HARADA, N.; MITSUYA, Y.; MATSUZAKI, H.; MITSUYA, H. 2003. A nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-nitro-l-argininemethyl- ester, exerts potent antiangiogenic effects on lasmacytoma in a newly established multiple myeloma severe combined immunodeficient mouse model. **British Journal of Haematology**, **120**: 396-404.

VACCA, A.; SCAVELLI, C.; MONTEFUSCO, V.; PIETRO, DI G.; NERI, A.; MATTIOLI, M.; BICCIATO, S.; NICO, B.; RIBATTI, D.; DAMMACCO, F.; CORRADINI, P. 2005. Thalidomide downregulates angiogenic genes in bone marrow endothelial cells of patients with active multiple myeloma. **Journal of Clinical Oncology**, **23**: 5334-5346.

VAN GINDERACHTER, J.A.; MOVAHEDI, K.; HASSANZADEH, G.G.; MEERSCHAUT, S.; BESCHIN, A.; RAES, G.; DE BAETSELIER, P. 2006. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology**, **211**: 487-501.

VAN HORSSSEN, R.; TEN HAGEN, T.L.; EGGERMONT, A.M. 2006. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. **Oncologist**, **11(4)**: 397-408.

VASVARI, G.P.; DYCKHOFF, G.; KASHFI, F.; LEMKE, B.; LOHR, J.; HELMKE, B.M.; SCHIRRMACHER, V.; PLINKERT, P.K.; BECKHOVE, P.; HEROLD-MENDE, C.C. 2007. Combination of thalidomide and cisplatin in an head and neck squamous cell carcinomas model results in an enhanced antiangiogenic activity in vitro and in vivo. **International Journal of Cancer**, **121**: 1697-1704.

VERGHESE, M.W.; MCCONNELL, R.T.; STRICKLAND, A.B.; GOODING, R.C.; STIMPSON, S.A.; YARNALL, D.P.; TAYLOR, J.D.; FURDON, P.J. 1995. Differential regulation of human monocyte-derived TNF alpha and IL-1 beta by type IV cAMP-phosphodiesterase (cAMP-PDE) inhibitors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **272(3)**: 1313-1320.

VERBON, A.; JUFFERMANS, N. P.; SPEELMAN, P.; VAN DEVENTER, S. J.; ten BERGE, I. J.; GUCHELAAR, H. J.; VAN DER POLL, T. 2000. A Single Oral Dose of Thalidomide enhances the capacity of lymphocytes to secrete gamma interferon in healthy humans. **Antimicrob Agents Chemother**, **44**: 2286-2290.

XU, W.; CELERIDAD, M.; SANKAR, S.; WEBB, D. R.; BENNETT, B. L. 2008. CC4047 promotes Th1 cell differentiation and reprograms polarized human Th2 cells by enhancing transcription factor t-bet. **Clinical Immunology**, **128**: 392-399.

ZHANG, L.; CHEN, S.L.; CHEN, W.M.; LIU, J.W. 2005. The interaction of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma. **Chinese Journal of Internal Medicine**, **44**: 85-88.

ZHENG, Y.; MANZOTTI, C.N.; LIU, M.; BURKE, F.; MEAD, K.I.; SANSOM, D.M. 2004. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. **The Journal of Immunology**, **172**: 2778-2784.

ZHENG, S.G.; WANG, J.H.; STOHL, W.; KIM, K.S.; GRAY, J.D.; HORWITZ D. A. 2006. TGF- $\beta$  Requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. **The Journal of Immunology**, **176**: 3321-3329.

ZHU, X.; GIORDANO, T.; YU, Q.; HOLLOWAY, H.W.; PERRY, T.A.; LAHIRI, D.K.; BROSSI, A.; GREIG, N.H. 2003. Thiothalidomides: novel isosteric analogues of thalidomide with enhanced TNF- $\alpha$  inhibitory activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, **46**: 5222-5229.

ZWINGENBERGER, K.; WNENDT, S 1996. Immunomodulation by thalidomide: systematic review of the literature and of unpublished observations. **Journal of Inflammation**, **46**: 177-211.

YAMADA, H.; NAKASHIMA, Y.; OKAZAKI, K.; MAWATARI, T.; FUKUSHI, J.I.; KAIBARA, N.; HORI, A.; IWAMOTO, Y.; YOSHIKAI, Y. 2007. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, **67(9)**: 1299-1304.

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

YUN, J.J.; FISCHBEIN, M.P.; WHITING, D.; IRIE, Y.; FISHBEIN, M.C.; BURDICK, M.D.; BELPERIO, J.; STRIETER, R.M.; LAKS, H.; BERLINER, J.A.; ARDEHALI, A. 2002. The role of MIG/CXCL9 in cardiac allograft vasculopathy. **American Journal of Pathology**, **161(4)**: 1307-1313.

WEINSTEIN, S.L.; GOLD, M.R.; DEFRANCO, A.L. 1991. Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, **88(10)**: 4148-4152.

WENZEL, J.; ZAHN, S.; MIKUS, S.; WIECHERT, A.; BIEBER, T.; TUTING, T. 2007. The expression pattern of interferon-inducible proteins reflects the characteristic histological distribution of infiltrating immune cells in different cutaneous lupus erythematosus subsets. **British Journal of Dermatology**, **157**: 752-757.

WNENDT, S.; ZWINGENBERGER, K. 1997. Thalidomide's chirality. **Nature**, **385**: 303-304.

WOLF, A.M.; WOLF, D.; STEURER, M.; GASTL, G.; GUNSILIUS, E.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. 2003. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. **Clinical Cancer Research**, **9**: 606-612.

WONG, C.K.; LIT, L.C.; TAM, L.S.; LI, E.K.; LAM, C.W. 2005. Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology (Oxford)**, **44**: 989-994.

**ANEXOS**

Patente requerida no INPI n° 02009003608S