

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Daniel Serra de Carvalho

Tese de Doutorado:

TALIDOMIDA: ALVOS ASSOCIADOS AO CONTROLE DO ERITEMA
NODOSO LEPROSO E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS ANÁLOGOS.

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Aos meus pais Alexandre e Sônia, irmãos Alexandre e Marcelo e sobrinho Renan, fontes de constante apoio, inspiração e carinho.

À memória e ao desejo do meu irmão Alexandre para que os estudos fossem uma constante em minha vida.

Aos amigos, pela convivência, paciência, alegrias e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a minha orientadora Dra. Elizabeth Pereira Sampaio e a chefe do Laboratório de Hanseníase - FIOCRUZ-RJ Dra. Euzenir Nunes Sarno pela oportunidade e orientação técnico científica que permitiu realizar esta tese. Também sou grato a toda equipe atual e antiga do laboratório de hanseníase pela estrutura oferecida, apoio técnico e amizade:

Andressa Cristina	Dra. Maristela Hernandez	Leonardo Gusmão
Bruno Figueiredo	Dra. Roberta Olmo	M ^º . Ana Caroline Silva
Bruno Jorge	Dra. Rosane Teles	M ^º . Ariane Oliveira
Daniel Chaves	Dra. Thaís Amadeu	M ^º . Danielle Moura
Daniel Pedrosa	Dra. Veronica Schimitz	M ^º . Jorgenilce Sales
Denise Moura	Dra. Ximena Rojas	M ^º . Mateus Moraes
Dr. José Augusto Nery	Eliane Oliveira	M ^º . Rafael Petito
Dr. Milton Moraes	Glauce Santos	M ^º . Tatiana Fulco
Dr. Paulo Redner	Helen Ferreira	M ^º . Tatiana Silva
Dr. Sergio Antunes	José Augusto	Pamela Rodrigues
Dra. Ana Maria Sales	Leonardo Barros	Rose Teles

Aos nossos colaboradores externos, sem os quais seria inviável a realização deste trabalho:

Dr. Eliezer J. Barreiro - UFRJ
Dra. Lidia M. Lima - UFRJ
Dr. Ulisses G. Lopes - UFRJ
Dra. Regina P. Markus - USP
Dra. Zulma S. Ferreira - USP
Dra. Veronica Morandi - UERJ

Apoio Financeiro:

FIOCRUZ
CNPq

“Quem não está convencido de que todas as manifestações da essência humana, a sensibilidade e a razão, a intuição e o entendimento, devem ser desenvolvidas para se tornarem uma decisiva unidade, independentemente de quais destas qualidades se tornem predominantes em cada um, passará a vida se esgotando nesta redução desagradável e nunca compreenderá, porque tem tantos inimigos tenazes e porque ele mesmo às vezes também vai confrontar outros como inimigo. Assim, um homem nascido e formado para as assim chamadas ciências exatas, quando estiver no ápice de sua razão-entendimento, não compreenderá facilmente que pode haver também uma fantasia sensível exata, sem a qual a arte é impensável.”

Johann Wolfgang von Goethe.

RESUMO

CARVALHO, Daniel Serra. Talidomida: Alvos associados ao controle do Eritema Nodoso Leproso e avaliação de compostos análogos. Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Durante o curso crônico da hanseníase, cerca de 50% dos pacientes hansenianos desenvolvem estados reacionais. Estes constituem episódios agudos de resposta inflamatória e imunológica, não relacionados a infecções secundárias, e que podem se manifestar nas várias formas da doença. Os pacientes multibacilares podem ser acometidos pelo eritema nodoso leproso (ENL), nestes casos surgem novas lesões cutâneas associadas a sintomas sistêmicos, sendo uma das principais causas de internação e morbidade relacionada à hanseníase. Todos os casos de ENL devem receber cuidados imediatos e serem tratados com anti-inflamatórios, sendo a talidomida umas das drogas de escolha para o seu tratamento. Avaliamos a ação da talidomida no tratamento do ENL, verificando nas lesões o aumento da expressão gênica de citocinas correlacionadas com a atividade de células T, possivelmente células reguladoras, devido ao aumento concomitante de citocinas tais como TNF, IFN γ , IL-2, IL-10, o fator de transcrição característico de células Treg Foxp-3 e o receptor de quimiocinas CCR5. Verificamos também que há alterações na microvasculatura nas lesões de ENL juntamente com a modulação negativa de genes pró-angiogênicos (VEGF-A, IL-8, COX-2) após tratamento com a talidomida. A talidomida também demonstrou capacidade de reduzir a ativação de células endoteliais causado pelo TNF, reduzindo a expressão de IL-8, COX-2, VEGF-A e do próprio TNF. Em paralelo, comparamos *in vitro*, as propriedades anti-inflamatórias e antiangiogênicas da talidomida e do análogo LASSBio-542. O análogo reduz a produção de TNF induzido por LPS em PBMC humana, porém diferente da talidomida, reduziu a produção de IL-10. Verificamos que o análogo reduz a ativação do fator de transcrição NF κ B por TNF em PBMC humana. O potencial anti-angiogênico do análogo LASSBio-542 foi demonstrado pela sua capacidade em reduzir a expressão de genes pró-angiogênicos induzidos por TNF em HUVEC, bem como a redução na formação de estruturas tubulares sobre matrigel. A descrição dos genes modulados pela talidomida nas lesões em regressão comprova o papel da angiogênese no desenvolvimento do ENL e sugere que o potencial co-estimulatório da talidomida sobre a atividade das células T associado às propriedades antiangiogênicas possam participar do processo de melhora dos pacientes, indicando possíveis novos alvos terapêuticos.

ABSTRACT

CARVALHO, Daniel Serra. Talidomida: Alvos associados ao controle do Eritema Nodoso Leproso e avaliação de compostos análogos. Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

During the chronic course of leprosy, half of patients develop reactional states. These acute episodes of inflammatory and immunological responses, are not related to secondary infections and can be manifested in many leprosy forms. The multibacillary patients can be committed by erithema nodosum leprosum (ENL) and in these cases new cutaneous lesions become associated with systemic symptoms (one of the major cause of internation and morbidity related to leprosy). All ENL cases must be treated immediately with antiinflammatory drugs, as thalidomide. The thalidomide action was analyzed in ENL treatment and a high expression of cytokines related to T cell activity – as TNF, IFN γ , IL-2, IL-10, Foxp-3 and CCR-5 - (regulatory cells, passively) were verified in skin lesions. Alterations in microvasculature of ENL skin lesions and negative modulation of pro-angiogenic genes (VEGF-A, IL-8 and COX-2) were verified after thalidomide treatment. Thalidomide had capacity to reduce the endothelial cells activation caused by TNF, with reduce expression of IL-8, COX-2, VEGF-A and TNF. Together with this data, the antiinflammatory and anti-angiogenic proprieties of thalidomide and its analog (LASSBio-542) were compared *in vitro*. The analog reduce the TNF production induced by LPS in human PBMC, but in contrast the IL-10 production was reduced. Besides, it was verified that the analog reduces NF κ B activation induced by TNF in human PBMC. The anti-angiogenic potential of LASSBio-542 was detected when the pro-angiogenic gene expression was reduced in HUVEC after TNF treatment, as well the reduction of formation of tubular structure above matrigel. The description of modulated genes by thalidomide in regression of lesions, proved the angiogenic role in ENL development and suggests the thalidomide as a potential co-stimulatory on T cells activities, resulting in patients improvement.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida

AINES -.Antiinflamatórios Não-Esteroidais

Ang - Angiopoetina

APC – Célula Apresentadora de Antígenos

BB - Borderline Borderline

BL - Borderline Lepromatoso

BT - Borderline Tuberculoide

COX.- Ciclooxigenase

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxi-Ribonucléico

EDTA.- Ácido Etileno Diamino Tetracético

EGF - Fator de Crescimento Epidérmico

ELISA - Ensaio de Imuenzimático

ENL - Eritema Nodoso Leproso

EPCs - Células Endoteliais Precursoras

Foxp3 - *forkhead box p3*

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HUVEC - células Endoteliais de Veias De Cordão Umbilical

IB - Índice Baciloscopico

ICAM.- Molécula de Adesão Intercelular

IFN γ – Interferon γ

IL – Interleucina

IP-10/CXCL-10 - Proteína de 10kDa induzível por IFN γ

LAM - Lipoarabinomanam

LASSBio - Laboratório de Síntese e Avaliação de Substancias Bioativas

LL – Hanseníase Lepromatosa

LPS - Lipopolissacarídeo.

MAPKs - Proteína Ativada por Mitógenos

MCP-1/CCL2 - proteína quimiotática de macrófago

MEC.- Matriz Extracelular

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

MIP-1 α /CCL3 - Proteína Inflamatória de Macrófagos

MMP - Metaloproteinases de Matriz

NF- κ B - Fator de Transcrição Nuclear κ B

NK – Natural Killer

NO - Óxido Nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAF - Fator Ativador de Plaquetas

PBMC - Células Mononucleares de Sangue Periférico

PBS - Tampão Fosfato-Salino

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PGL-1 - Glicolípido Fenólico Específico do *M. Leprae*

PHS - Prostaglandina H sintase.

PTEN - Proteína Homóloga à Fosfatase e Tensina

RANTES/CCL5 - Quimiocina Regulada por Ativação Expressa e Secretada Por Células T Normais

RNA - Ácido Ribonucléico

RR - Reação Reversa

SFB - Soro Fetal Bovino

SNP - Polimorfismo de Base Única

TCR - Receptor de Células T

TGF-B – Fator de Transformação De Crescimento B

Th1 - Linfócitos T auxiliares do tipo 1

Th2 - Linfócitos T auxiliares do tipo 2

TLR - Receptor do Tipo Toll

TNF – Fator De Necrose Tumoral alfa

TNFR - Receptor De TNF

Treg- T regulatória

TT – Hanseníase Tuberculoide

VCAM - Molécula de Adesão da Célula Vascular

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	10
1.2. ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE	12
1.3. ESTADOS REACIONAIS OBSERVADOS NA HANSENÍASE	19
1.4. ANGIOGÊNESE	22
1.5. TALIDOMIDA.....	25
1.6. PROPRIEDADES QUÍMICAS DA TALIDOMIDA.....	28
1.7. MECANISMO DE AÇÃO DA TALIDOMIDA.....	31
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. OBJETIVO GERAL.....	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3. METODOLOGIAS	37
3.1. POPULAÇÃO ESTUDADA.....	37
3.2. BIÓPSIAS	37
3.3. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA.....	38
3.4. RT-PCR EM TEMPO REAL	39
3.5. IMUNOHISTOQUÍMICA.....	41
3.6. TALIDOMIDA E ANÁLOGOS	41
3.7. OBTENÇÃO DE PBMC E PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS CD4 ⁺	42
3.8. CÉLULAS ENDOTELIAIS E ANGIOGÊNESE.....	44
3.9. ELISA.....	46
3.10. ATIVAÇÃO DE NF-κB.....	46
3.11. CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO.....	48
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4. RESULTADOS	50
4.1. EXPRESSÃO GÊNICA EM LESÕES DE ENL APÓS TRATAMENTO COM TALIDOMIDA.....	50
4.2. TALIDOMIDA E ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T	64
4.3. ANGIOGÊNESE E ENL	67
4.4. ANÁLOGOS DA TALIDOMIDA	72
5. DISCUSSÃO	81
6. REFERÊNCIAS	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A regulação dos eventos inflamatórios indesejados, tais como edema, dor, febre, e mais especificamente as lesões teciduais, principalmente, em tecidos nobres e altamente especializados, com baixa capacidade de regeneração, são objetivos que acompanham a história da medicina desde o seu início. Diversos mecanismos de contenção do sistema imune já foram descritos, sendo os antiinflamatórios não esteroidais (que controlam a síntese de prostaglandinas) e esteroidais (que agem de forma não seletiva sobre o organismo (incluindo o sistema imune via receptores citoplasmáticos de glicocorticóides) as principais ferramentas de controle, porém, novas abordagens através do conhecimento de vias específicas de ativação e manutenção dos diversos tipos de resposta imune têm sido fundamental para encontrar novos alvos terapêuticos (Rhen *et al.*, 2005).

Em várias situações, tais como nas doenças auto-imunes, doenças inflamatórias crônicas, síndromes metabólicas e alguns tipos de malignidades há a necessidade de intervenções específicas, portanto tratamentos que possuem como alvo a modulação da produção de citocinas e vias de manutenção da ativação das células do sistema imune vêm sendo alvo para o desenvolvimento de novas terapias e drogas (Carvalho *et al.*, 2007).

A hanseníase, por se tratar de uma doença infecciosa crônica caracterizada por um espectro de formas clínicas classificadas de acordo com o nível de resposta imune celular contra os antígenos do agente infeccioso (*Mycobacterium leprae*), é um modelo de estudo que traz informações importantes para a compreensão do sistema imune. Uma das principais dúvidas na hanseníase é o fato dos pacientes do pólo lepromatoso (LL), onde há ausência de

resposta imune celular contra o *M. leprae*, desenvolvem um quadro de reação sistêmica aguda chamada eritema nodoso leproso (ENL). O envolvimento do fator de necrose tumoral (TNF) nesses episódios reacionais é destacado como determinante e o uso de drogas que reduzem sua produção como a talidomida e a pentoxifilina são capazes de levar à regressão do ENL (Sampaio *et al.*, 1991). Porém diversas dúvidas persistem, principalmente sobre o mecanismo para disparar o quadro do ENL e os fatores que contribuem para a sua manutenção. Portanto, o nosso interesse em estudar os pacientes que desenvolvem o ENL e que são tratados com talidomida visa buscar respostas que contribuam para o esclarecimento dessas dúvidas.

A talidomida foi a primeira droga aprovada especificamente para a redução da produção de TNF em 1991, enquanto o primeiro bloqueador da ação de TNF no organismo, o imunobiológico Etanercept só entrou no mercado em 1998. O pobre conhecimento sobre o mecanismo específico de ação da talidomida, o estigma sobre o seu potencial teratogênico, fez com que novas drogas baseadas na sua estrutura fossem buscadas. Nos últimos anos, alguns estudos procuraram estabelecer o mecanismo de ação da talidomida, juntamente com novas propriedades e aplicações clínicas (Sampaio *et al.*, 2002). Uma melhor compreensão sobre o ENL pode ser obtida através dos estudos recentes que demonstraram algumas propriedades da talidomida, tais como a sua função sobre a formação de novos vasos sanguíneos. Uma vez que o mecanismo de ação da Talidomida não foi completamente elucidado, no presente estudo nos propusemos a avaliar a ação da talidomida, verificando a modulação da expressão gênica de moléculas correlacionadas com o sistema imune nas lesões reacionais de pacientes com hanseníase, dando um enfoque no papel da microvasculatura presente. Em paralelo, comparamos as propriedades antiinflamatórias *in vitro* da talidomida e um de seus análogos (LASSBio-542) sobre o sistema imune e angiogênese.

1.2. ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença infecciosa sistêmica de curso crônico, que afeta principalmente os nervos periféricos, a pele e a mucosa das vias aéreas superiores. O *M. leprae*, seu agente etiológico, é capaz de infectar macrófagos, células de *Schwann* e o endotélio vascular. Admite-se que a via de entrada do *M. leprae* é o trato respiratório superior, por onde atinge a mucosa e dissemina-se pelo organismo. A hipótese da via de transmissão aérea é confirmada pela grande quantidade de bacilos íntegros isolados de secreções nasais de pacientes. Também é considerada uma doença incapacitante, uma vez que ocorre dano neural causado pela invasão do *M. leprae* e comprometimento do sistema nervoso periférico, irreversível em vários casos (Gallo *et al.*, 2005).

Para o diagnóstico da hanseníase se faz necessário o exame clínico, acompanhado de exame baciloscópico em esfregaços de linfa e de exame histopatológico. Os sinais e sintomas são variados e podem contribuir para o retardamento do diagnóstico e início do tratamento. As lesões podem se apresentar como uma única mancha hipocrômica ou até como inúmeras manchas pápulo-eritematosas por todo o corpo, podendo também ter perda de sensibilidade. Contudo, cerca de 30% das lesões não são anestésicas, o que pode dificultar ainda mais o diagnóstico da doença (Gallo *et al.*, 2005).

Clinicamente, as diferentes formas da hanseníase são caracterizadas em virtude do equilíbrio entre a multiplicação bacilar e o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro. O grau de disseminação da infecção e o número de lesões cutâneas variam ao longo de um espectro de formas clínicas. Ridley e Jopling postularam em 1965 uma classificação para estas formas clínicas da hanseníase, na qual as divide em duas formas polares: tuberculóide (TT) e lepromatosa (LL - também chamada de virchowiana), e três formas intermediárias

denominadas “borderlines”, a saber: BT, BB e BL, como mostrado na Figura 1 (Ridley *et al.*, 1966).

No pólo LL do espectro estão pacientes com ausência seletiva de resposta imunológica do tipo celular contra a bactéria, que apresentam uma alta carga bacilar principalmente nos macrófagos da pele e nas células de *Schwann* em torno de nervos periféricos, e elevados títulos de anticorpos específicos. Nestes doentes, a reação cutânea à lepromina é negativa e múltiplas lesões estão presentes. As lesões nervosas resultam de um lento e progressivo processo, que acomete principalmente os nervos cutâneos (Gallo *et al.*, 2005).

No pólo TT, os pacientes apresentam resposta imune celular contra o *M. leprae*, que reduz a disseminação da bactéria. De fato, a resposta imune não protege totalmente estes pacientes contra a doença, e pode estar diretamente envolvida no mecanismo de lesão do nervo. Em contraste com a forma lepromatosa, na tuberculóide, os pacientes apresentam baixos níveis de anticorpos. A forma tuberculóide caracteriza-se pela formação de granulomas epitelióides que invariavelmente comprometem as terminações nervosas periféricas, destruindo-as. Nestes, poucas bactérias estão presentes e os pacientes apresentam, em geral, uma única lesão e a reação cutânea a lepromina é sempre positiva. As formas clínicas intermediárias (pacientes borderline) representam gradações na reatividade imune destes indivíduos em resposta à bactéria e são classificados conforme sua maior proximidade do pólo lepromatoso ou tuberculóide (Gallo *et al.*, 2005; Ridley *et al.*, 1966).

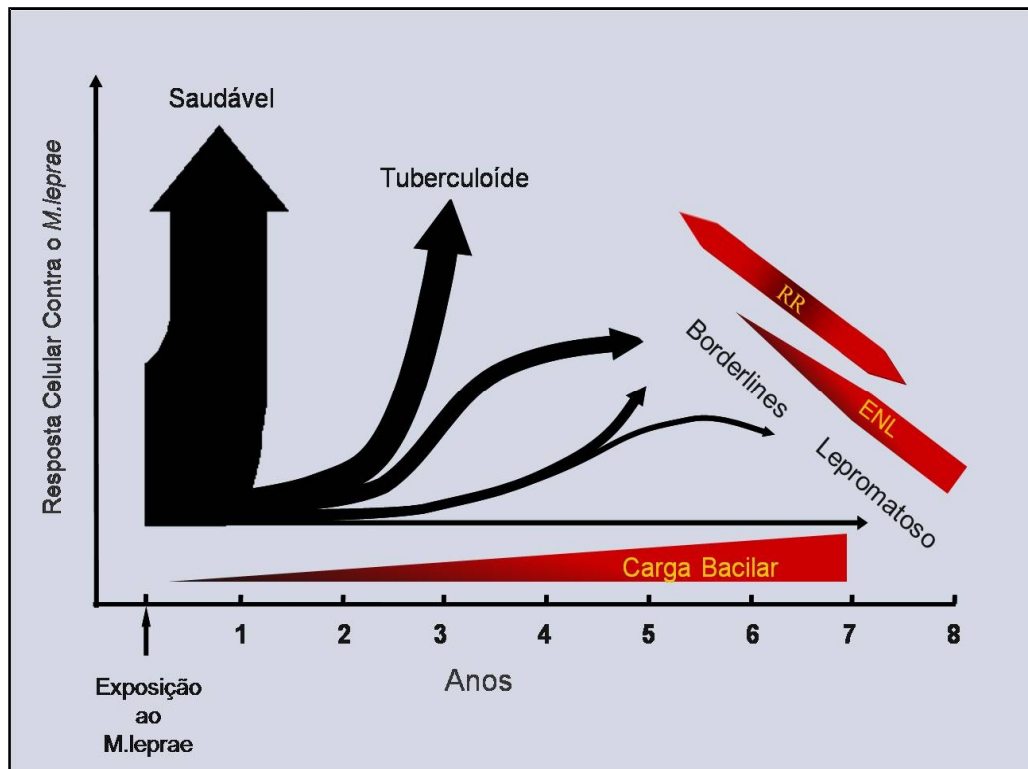


Figura-1. Representação esquemática das formas clínicas da hanseníase. Após a exposição ao bacilo, a infecção pode ser controlada quando há uma resposta celular efetiva contra o *M. leprae*. Contudo, nos casos onde há uma resposta celular prejudicada contra o *M. leprae* especificamente, ocorre a proliferação e a manifestação da doença. Durante curso crônico da doença, os pacientes com baixa ou ausente resposta contra o *M. leprae* podem desenvolver episódios reacionais característicos, a Reação Reversa (RR) e o Eritema Nodoso Leproso (ENL).

Devido à dificuldade na realização dos exames histopatológicos e visando a descentralização do acompanhamento médico dos pacientes, a Organização Mundial da Saúde (OMS) sugeriu aos países endêmicos que adotassem uma simplificação do critério diagnóstico de acordo com o índice baciloscópico (IB) feito a partir de esfregaços de linfa. De um modo geral, pacientes tuberculóides (BT e TT) são paucibacilares, com $IB=0$ e pacientes lepromatosos são multibacilares, com $IB>0$ podendo variar até +6 (Gallo *et al.*, 2005).

O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, que apresenta baixa atividade catabólica e até hoje não foi possível cultivá-lo *in vitro*. A obtenção de *M. leprae* para pesquisa é feita através da purificação do bacilo que se replica em coxim plantar de camundongos e de tatus de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*, Linn.) que sofrem infecção

disseminada, sendo que o seu fígado concentra cerca de 10^9 bacilos por grama de tecido (Scollard *et al.*, 2006). O tempo de geração do bacilo varia entre 11 a 14 dias; é Gram-positivo, álcool-ácido resistente, não cultivável *in vitro* e de crescimento muito lento. O *M. leprae* possui uma densa cápsula composta de lipídeos situada externamente à sua parede celular, e rica no glicolípido fenólico específico do *M. leprae* (PGL-1) (Jayapal *et al.*, 2001). Esta cápsula protege o bacilo da ação de radicais livres e espécies reativas do oxigênio permitindo a sobrevivência intracelular do bacilo. O PGL-1 serve como um antígeno para testes sorológicos da hanseníase (Jayapal *et al.*, 2001). Além do PGL-1 existem outros antígenos situados na parede celular do *M. leprae*, dentre estes um complexo de lipoglicanas chamado de Lipoarabinomana (LAM) capaz de estimular monócitos e envolvido na anergia de linfócitos nos pacientes multibacilares (Hunter *et al.*, 1981; Mehra *et al.*, 1984; Peterson *et al.*, 1995; Scollard *et al.*, 2006).

Os paucibacilares recebem uma dose mensal de rifampicina de 600mg e dapsona de 100 mg, uma vez ao mês na unidade de saúde (dose supervisionada) e levam o restante da cartela para auto-administração de um comprimido de dapsona por dia por 30 dias. A duração do tratamento é de seis meses. Para os multibacilares a dose supervisionada consta de rifampicina 600mg, associada à clofazimina 300mg e dapsona 100mg; o restante da cartela para auto-administração de um comprimido diário de 100mg de clofazimina e 1 comprimido diário de 100mg de dapsona. A duração do tratamento é de 12 meses. Após ter completado o tempo de tratamento, com regularidade, o paciente recebe alta e é considerado curado. A implantação desse modelo de tratamento na década de 80 foi fundamental para a redução do número de casos de hanseníase, quando a doença ainda era endêmica em 122 países com aproximadamente 14 milhões de casos diagnosticados. Segundo a OMS, em 2006, o número de casos registrados foi de 259.017 indivíduos, em particular nos seguintes países: Angola,

Brasil, República Africana Central, República Democrática do Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e Unidade Republicana da Tanzânia. Em conjunto, esses países respondem por 84% da prevalência mundial. Na Figura 2 é mostrada a taxa de prevalência nos países endêmicos (WHO, 2007).

No Brasil a doença ainda constitui um problema de saúde pública, apesar da grande queda na prevalência dos casos de hanseníase no mundo nas duas últimas décadas, com taxa de prevalência de 1,6 indivíduos para cada 10.000 habitantes e cerca de 65.000 casos registrados em 2006. Dentre os novos casos diagnosticados no Brasil, mais da metade manifesta uma das formas multibacilares da doença, sendo que 8% ocorrem em menores de 14 anos e um número significativo de casos com algum grau de incapacidade física já é observado no momento do diagnóstico (WHO, 2007).

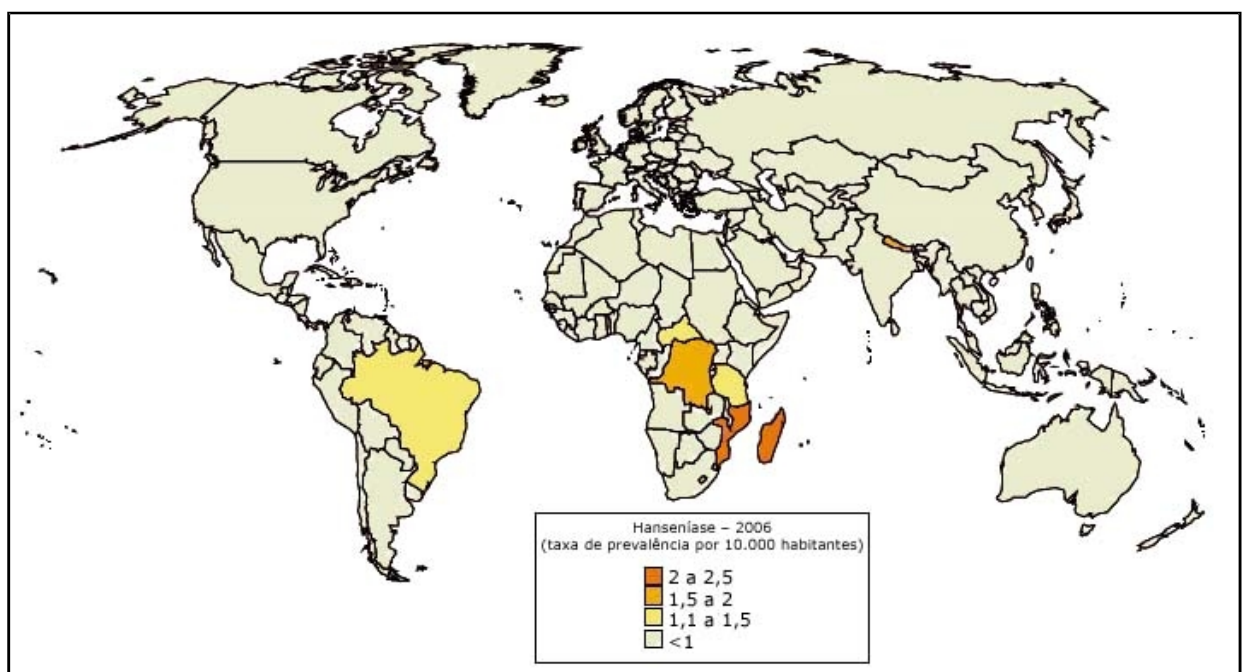


Figura 2. Taxa de prevalência da hanseníase até o final de 2006 segundo a OMS. (Adaptado de: <http://www.who.int/wer>, acesso em 25/05/2009).

O simples contato com pessoas infectadas, o que pode levar à exposição ao bacilo, não garante o desenvolvimento da doença. Um conjunto de fatores ainda desconhecidos é necessário para que haja a permissividade para a proliferação, mesmo que lentíssima, do *M. leprae*. Atualmente aceitam-se algumas hipóteses para esta susceptibilidade imunológica que leva à hanseníase, dentre elas as principais são: a) um defeito básico, de origem genética, que compromete a função efetora durante a fase inata da defesa contra a infecção; b) diferenciação da resposta imune celular para um padrão funcional ineficaz para a destruição do patógeno. Nos pacientes lepromatosos observa-se um defeito funcional nos linfócitos T, não respondendo ou sendo hiporresponsivos especificamente ao *M. leprae*, diferente dos pacientes tuberculóides, porém em ambos os casos foi permitida a proliferação do bacilo. Algumas associações genéticas já foram descritas como possíveis contribuintes para a doença tais como polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs) em genes para citocinas, quimiocinas, receptores e proteínas envolvidas com a sinalização intracelular, apontando para uma combinação de fatores de susceptibilidade e resistência o que pode explicar a forma espectral da hanseníase, tais como os genes: *HLA*, *TNF*, *LTA*, *IL10*, *PARK2*, *PACRG*, *IL12*, *IL23*, *IFN γ* , *VDR*, *TLRs*, *MBL*, *NRAMP*, *CTLA4* e *HSP70* (Souza *et al.*, 2007).

A resposta imune específica contra o *M. leprae* é capaz de impedir disseminação da bactéria, mas freqüentemente, provoca danos aos nervos, como no caso dos pacientes do pólo tuberculóide. De fato, a resposta imune não protege totalmente estes pacientes contra a doença, e pode estar diretamente envolvida no mecanismo de lesão do nervo. Nestes casos, poucas bactérias estão presentes e os pacientes apresentam, em geral, uma única lesão. O que reforça a idéia de que múltiplos fatores estão envolvidos para a permissão da proliferação do bacilo e desenvolvimento da doença, mesmo que seja nos pacientes tuberculóides que respondem contra o *M. leprae* (Little *et al.*, 2001).

Uma lesão de pele de paciente lepromatoso concentra aproximadamente 10^{10} bacilos/grama de tecido, mostrando que em um micro-ambiente com função efetora inadequada, o patógeno cresce em elevadas concentrações. Além disso, pacientes multibacilares podem eliminar grande número de *M. leprae* pelas vias aéreas superiores, em média 10^7 bacilos viáveis por dia. Os componentes do *M. leprae*, por serem antigênicos e desempenharem outras atividades biológicas inibidoras de resposta inflamatória e imune, acentuam ainda mais o defeito funcional observado nesses pacientes. Apesar dos pacientes lepromatosos possuírem elevados níveis de anticorpos anti-*M. leprae*, a resposta humoral não confere proteção por tratar-se de um patógeno intracelular (Scollard *et al.*, 1996). Mesmo assim, o *M. leprae* não apresenta variações morfológicas e funcionais em cepas isoladas de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença, de forma a explicar a ausência de resposta imune celular em pacientes lepromatosos (Bloom *et al.*, 1992; Kaplan *et al.*, 1988).

A não-resposta ou a hiporresponsividade específica ao *M. leprae*, característico da forma lepromatosa pode ser recuperada em algumas situações, como por exemplo, após longo período de tratamento e cura clínica. A possibilidade de reversão da resposta antígeno-específica nos pacientes lepromatosos, seja pelo tratamento, seja por imunomodulação, demonstra que as formas multibacilares da hanseníase não são estáticas. Os pacientes das formas “borderlines” apresentam variações imunológicas que podem ocorrer no curso da doença, sendo freqüentemente associadas às reações (Esquenazi *et al.*, 1990).

A demonstração da diferenciação de linfócitos T auxiliares (Th) 1 x (Th) 2 na hanseníase mostra de uma forma geral que, pacientes tuberculóides apresentam resposta imune celular efetiva na destruição do bacilo com produção local de citocinas predominantemente do tipo 1, incluindo Interferon gamma ($IFN\gamma$), Interleucina (IL)-2 e IL-12, e nos pacientes lepromatosos observa-se uma diferenciação da para um perfil associado à

produção preferencial de citocinas do tipo 2, especialmente IL-4 e IL-10 (Salgame *et al.*, 1992; Yamamura *et al.*, 1991).

1.3. ESTADOS REACIONAIS OBSERVADOS NA HANSENÍASE

Durante o curso crônico da doença, cerca de 50% dos pacientes hansenianos desenvolvem estados reacionais. Estes constituem episódios agudos de resposta inflamatória e imunológica, não relacionados a infecções secundárias, e que podem se manifestar em várias formas da doença. O aparecimento de novas lesões cutâneas e/ou a reinfilação de lesões pré-existentes são as principais características clínicas das reações, freqüentemente acompanhadas de sintomas sistêmicos como febre, mal estar, dor articular e neurítica (Britton *et al.*, 2004). As reações são classificadas em dois tipos de acordo com suas manifestações clínicas e histológicas: Reação Reversa (RR) ou Reação do tipo I e Eritema Nodoso Leproso (ENL) ou reação do tipo II (Sarno *et al.*, 1991).

A reação do tipo I é a que mais afeta pacientes das formas clínicas “borderlines” (BT, BB, BL), sendo caracterizada pelo aparecimento de lesões eritematosas na pele e pela emergência de imunidade celular aos antígenos do *M. leprae*, com produção de mediadores pró-inflamatórios nas lesões granulomatosas (Little *et al.*, 2001; Uyemura *et al.*, 1991). Têm sido observadas elevação na expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IFN γ , IL-2 e IL-12 em lesão cutânea e sangue durante a RR (Moraes *et al.*, 1999). Aumento nos níveis de IL-1 β e TNF em células sanguíneas também já foram observados (Manandhar *et al.*, 2002; Sarno *et al.*, 1991). Os episódios de RR estão associados a neurites severas, com lesão progressiva de nervos periféricos, e para o tratamento específico destes episódios reacionais são utilizados principalmente glicocorticóides (Manandhar *et al.*, 2002).

Os pacientes multibacilares polares ou subpolares (BL, LL) podem ser acometidos da reação tipo II ou eritema nodoso leproso (ENL), nestes casos surgem novas lesões cutâneas nodulares não associadas às lesões lepromatosas anteriores, eritematosas e dolorosas, que podem ulcerar quase sempre associadas à febre, perda de peso e mal estar geral. Histologicamente observa-se alterações vasculares da derme profunda com infiltrado inflamatório difuso de células mononucleares, intenso infiltrado neutrofílico e espessamento da epiderme. Alguns autores indicam que o ENL pode ser considerado como uma vasculite necrosante em vasos de diversos calibres da vasculatura cutânea e que a deposição de imunocomplexos resultantes dos altos títulos de anticorpos e componentes degradados do *M. leprae* das lesões lepromatosas nestes vasos seria fundamental para o desencadeamento da reação (Murphy *et al.*, 1986). Contudo, as diversas características imunológicas do ENL suportam a idéia de alterações mais complexas no sistema imune para o desencadeamento da reação.

A resposta inflamatória observada no desencadeamento do ENL é complexa, e o aumento considerável dos níveis séricos de TNF α , IL-1 β e IL-6 estão associados com a imunopatologia da reação e suas complicações sistêmicas (Moreira *et al.*, 1993; Sampaio *et al.*, 1998b; Sarno *et al.*, 1991). Existem alguns trabalhos que indicam o relacionamento do IFN γ com a super-expressão de TNF, como por exemplo, o aparecimento de ENL em pacientes hansenianos após injeção intradérmica de IFN γ (Sampaio *et al.*, 1992). No entanto, ainda não foram esclarecidos os mecanismos que levam pacientes com RR e ENL a apresentarem um aumento da produção de TNF.

A confirmação do envolvimento do TNF na patologia da hanseníase e em especial nos episódios reacionais direcionou o emprego de drogas inibidoras da produção desta citocina, como talidomida e pentoxifilina, para o tratamento dos pacientes em reação. A melhora

clínica dos pacientes foi correlacionada diretamente com a redução dos níveis séricos desta citocina, assim como restaurou a capacidade das células mononucleares desses pacientes em responder ao *M. leprae in vitro* (Sampaio *et al.*, 1998a).

Todos os casos de ENL devem receber cuidados imediatos e serem tratados com antiinflamatórios. Em casos graves ou frente a evidências de comprometimento ocular, neural, testicular, tem-se a preferência pelo início imediato do tratamento com corticosteróides.¹⁰ Casos de baixa gravidade de ENL podem ser tratados com antiinflamatórios não-esteroidais (AINES). A prednisona na dose de 0,5 a 2 mg por kg ao dia está indicada como antiinflamatório de escolha nos casos moderados a graves (Lockwood, 1996). Apesar da efetividade da corticoterapia, existe o grande risco dos pacientes tornarem-se dependentes dessa droga, especialmente aqueles com ENL crônico. A clofazimina também é utilizada para reduzir os surtos recorrentes de ENL, porém, seus efeitos antiinflamatórios em outras enfermidades e dissociados da sua ação antimicobacteriana na hanseníase, ainda não foi demonstrado (Helmy *et al.*, 1971).

O estudo da via pela qual o *M. leprae* é capaz de induzir a produção de TNF se torna de grande interesse, uma vez que esta citocina é compreendida como um fator chave na progressão clínica da hanseníase, incluindo o desenvolvimento dos episódios reacionais. O *M. leprae* é capaz de se ligar a receptores tipo Toll (TLR-2), receptores de manose (MMR), receptores do complemento 1 e 3, dentre outros ainda não descritos, e levar à ativação de vias intracelulares como as MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos), ativar fatores de transcrição tais como o fator nuclear κ B (NF- κ B) e levar à produção de TNF, assim como de várias outras proteínas por monócitos/macrófagos (Hasan *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003; Schlesinger *et al.*, 1990). Contudo, o entendimento das alterações nas vias intracelulares que fazem com que as células mononucleares de pacientes em reação e de

pólos opostos do espectro de formas clínicas apresentem diferentes níveis de respostas ao *M. leprae* ainda não foi alcançado.

1.4. ANGIOGÊNESE

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez em 1935 por Hertig para descrever a vascularização na placenta. O estudo sistemático da angiogênese teve início com Judah Folkman, e progressivamente foram desenvolvidos vários modelos *in vitro* e *in vivo* para o estudo de seus mecanismos moleculares, modulação e a sua importância nos processos fisiológicos e patológicos (Folkman *et al.*, 1992). Atualmente o termo angiogênese tem sido empregado para descrever o crescimento de brotos endoteliais a partir de vênulas pós-capilares preexistentes e para caracterizar os processos de crescimento e remodelamento de uma rede vascular primitiva em uma complexa. A angiogênese envolve distintas formas de crescimento vascular. Ela tem início com a dilatação de vênulas preexistentes, as quais podem sofrer brotamento, ou tornarem-se divididas por colunas de células periendothelias, processo denominado intussuscepção ou, por pontes de células transendothelias, as quais dividem o vaso em capilares distintos (Figura 3) (Benjamin *et al.*, 1998; Carmeliet *et al.*, 2000).

No indivíduo adulto, novos vasos surgem principalmente por angiogênese, embora a vasculogênese também possa ocorrer. Essa neovascularização também acontece pelo recrutamento de células semelhantes aos angioblastos, denominadas células progenitoras endoteliais (EPCs) da medula óssea (Conway *et al.*, 2001). Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no crescimento vascular diferem nos vários tecidos assim, os neovasos terão aspectos morfológicos e funcionais de acordo com as necessidades de cada tecido. Essa heterogeneidade das células endoteliais é determinada pela expressão e atividade de fatores angiogênicos, como por exemplo, fator de crescimento do endotélio vascular

(VEGF), Angiopoetina (Ang-1), que variam grandemente em diferentes tecidos e, por fatores angiogênicos órgão-específico que determinam a alteração angiogênica, mas de modo específico para os diferentes órgãos (Benjamin *et al.*, 1998; Carmeliet *et al.*, 2000; Carmeliet, 2003).

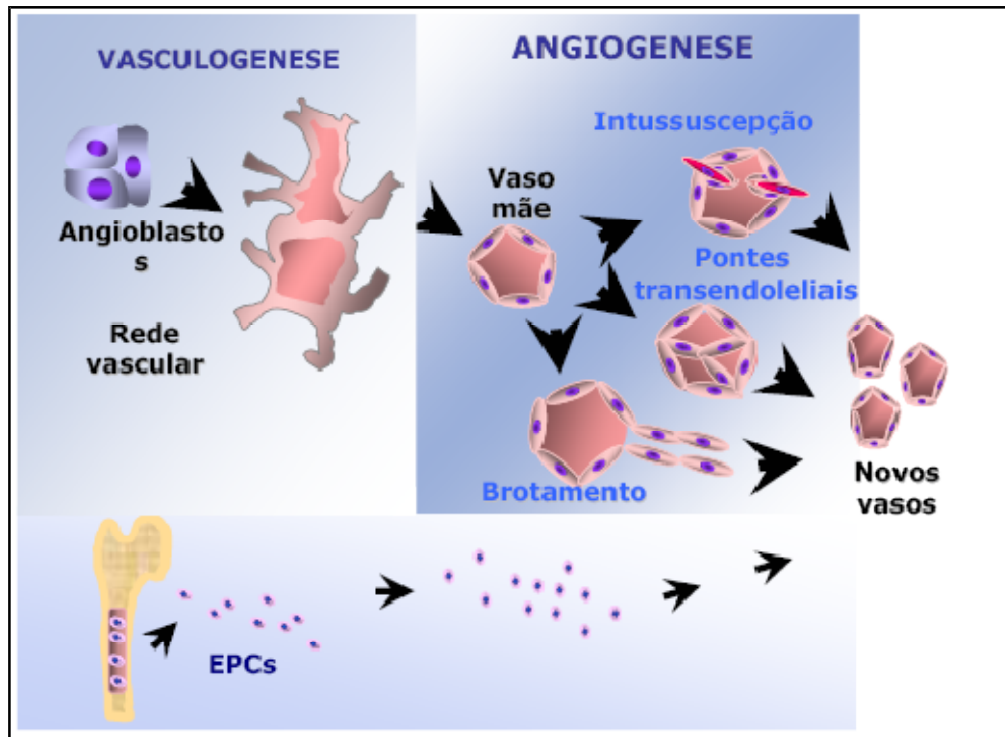


Figura-3. Formação Vascular. O esquema mostra a vasculogênese, os tipos de angiogênese: brotamento, o mais freqüente; intussuscepção e pontes trans-endoteliais e o recrutamento de células progenitoras endoteliais (EPCs) da medula óssea. Modificado de: Carmeliet, 2003.

Embora as células endoteliais sejam o foco da atenção, elas sozinhas podem iniciar, mas não completar a angiogênese. As células periendothelias são essenciais para o amadurecimento vascular. Essas células estabilizam o vaso nascente através da inibição da migração e da proliferação endotelial, e por estimular a produção de matriz extracelular. Elas proporcionam controle homeostático e protegem o novo vaso contra rupturas ou regressão (Carmeliet *et al.*, 2000).

As etapas da angiogênese envolvem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular em resposta ao óxido nítrico (NO) e VEGF, degradação da membrana basal por

metaloproteinases de matriz (MMPs), perda das junções entre as células endoteliais pela ação do ativador do plasminogênio, migração e proliferação das células endoteliais, formação de cordões endoteliais, formação de membrana basal, maturação e remodelamento, recrutamento de células periendoteliais (Figura 4) (Fan *et al.*, 2006; Jain, 2003).

A angiogênese está sujeita a um complexo sistema de controle com fatores angiogênicos e antiangiogênicos (angiostáticos). No indivíduo adulto o crescimento vascular está sob rigoroso controle, havendo uma predominância dos fatores angiostáticos sobre os angiogênicos. A neovascularização só ocorrerá quando esta relação for inversa. Como exemplo de fatores angiogênicos temos os pericitos, vários componentes da matriz extracelular como endostatina e tumstatin, fragmentos de colágeno tipo XVIII (matriz extracelular - MEC) e IV (membrana basal) respectivamente, trombospondina e de fatores pro-angiogênicos, a injúria, hipóxia, citocinas (VEGF, TNF), quimiocinas, angiogenina, células inflamatórias (Bernardini *et al.*, 2003; Szekanecz *et al.*, 2007).

Em circunstâncias normais a formação de novos vasos sanguíneos ocorre durante a cicatrização de feridas, regeneração de órgãos, no sistema reprodutor feminino na maturação do folículo ovariano, na formação do corpo lúteo, na regeneração do endométrio após o ciclo menstrual, na implantação do ovo e na formação da placenta. A angiogênese também é um fator importante em vários processos patológicos como no crescimento e metástase de tumores, na artrite reumatóide, na retinopatia diabética, na psoríase, obesidade, aterosclerose, isquemia, osteoporose, e outras (Burke *et al.*, 2001; Carmeliet, 2003; Folkman, 1995; Hoeben *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 1992).

Na hanseníase observa-se a participação da microvasclatura nas diversas lesões dermatológicas apresentadas pelos pacientes. É possível distinguir as lesões tanto

tuberculóides quanto lepromatosas pelo padrão da microvasculatura encontrada nas biópsias através de imunohistoquímica para o fator VIII da cascata de coagulação. As lesões lepromatosas apresentam densa microvasculatura tortuosa associada a macrófagos contendo bacilos, enquanto as lesões tuberculóides apresentam a microvasculatura somente na periferia dos granulomas (Antunes *et al.*, 2000). O aumento da carga bacilar também está associado à angiogênese na lesão lepromatosa (Bhandarkar *et al.*, 2007). Observa-se também um aumento da expressão de VEGF e seu receptor KDR nas células granulomatosas de pacientes RR.

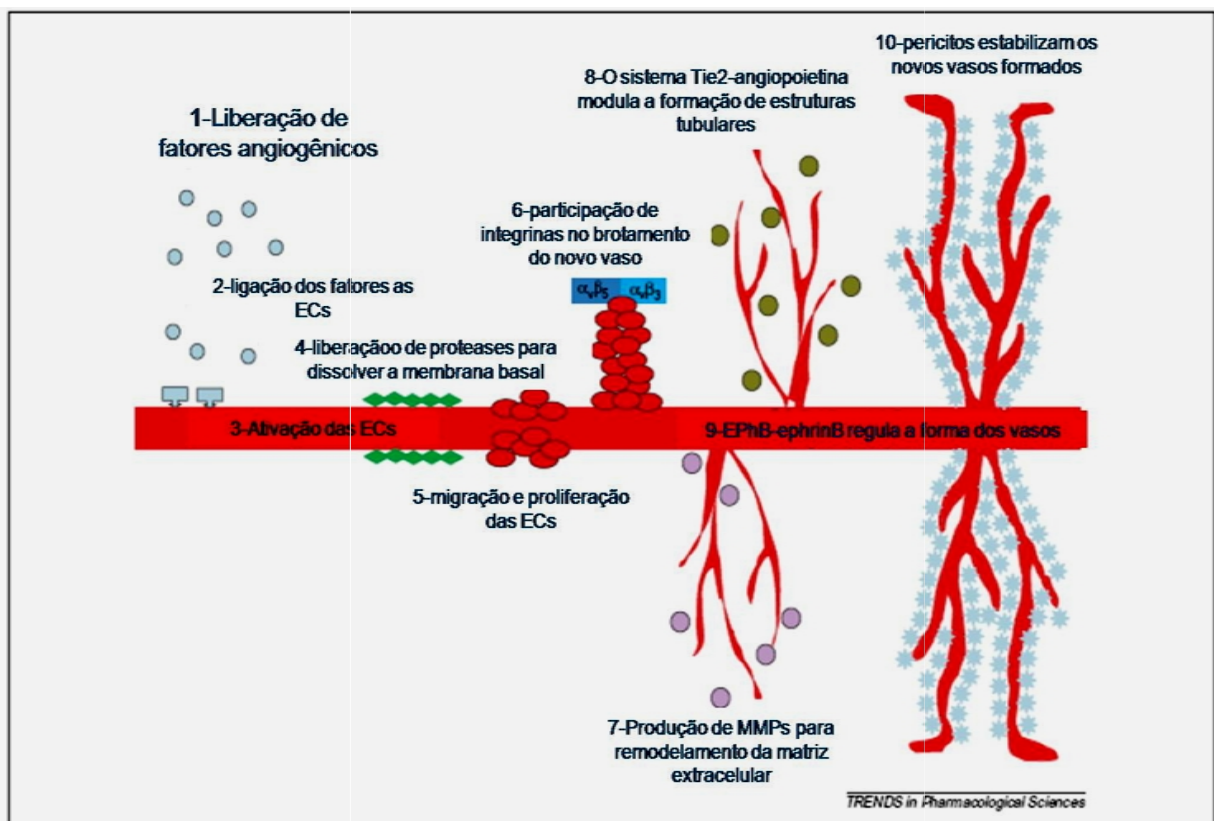


Figura-4 Etapas da angiogênese. Adaptado de Fan , 2006 (Fan *et al.*, 2006).

1.5. TALIDOMIDA

A talidomida foi introduzida no mercado no final dos anos cinquenta como sedativo e antiemético, buscando reduzir os enjoos matinais de mulheres grávidas. Infelizmente, o resultado deste emprego foi um desastre trágico e bastante conhecido na história da medicina,

afetando mais de 12 mil crianças que nasceram com deformidades (Botting, 2002). A talidomida foi então retirada do mercado no início dos anos sessenta devido a suas propriedades teratogênicas (Botting, 2002; Dolev, 2001).

Foi também no início dos anos sessenta que novas propriedades da talidomida começaram a ser descobertas, começando pela atenuação dos sintomas de pacientes hansenianos durante episódios de grave reação inflamatória (Sheskin, 1965; Sheskin, 1966). Somente trinta anos mais tarde, através de estudos para se desvendar o mecanismo de ação da talidomida na hanseníase, foi descrita a sua capacidade de modular o sistema imune através da redução da produção do TNF, o que reativou o interesse sobre esta droga (Sampaio *et al.*, 1991; Sampaio *et al.*, 1993). Alguns dos fatos mais importantes da história deste medicamento são mostrados na Figura 5.

Antes de se descobrir a capacidade de inibir a produção de TNF, vários grupos pesquisaram as propriedades da talidomida e fizeram o seu uso em doenças que possuíam sintomas semelhantes ao ENL. O conhecimento do efeito imunossupressor da talidomida surgiu praticamente junto com as observações da ação da talidomida no ENL, o que despertou o seu interesse para uso em doenças de base imunológica, bem como as que possuem manifestações dermatológicas, tais como o prurigo nodular, lúpus eritematoso discóide e sistêmico (Hasper *et al.*, 1982; Sheskin, 1975; Thomas *et al.*, 2000). A inibição da migração de leucócitos polimorfonucleares também foi um avanço considerável para o entendimento da ação da talidomida, que embora pudesse ser correlacionado com a inibição de TNF forneceu indícios para a descrição de outras ações da talidomida, como a redução de moléculas de adesão que além de reduzir a migração pode estar envolvida em processos de angiogênese e ativação celular (Faure *et al.*, 1980). Mais ainda, a talidomida foi utilizada com sucesso em pacientes que receberam transplantes heterólogos de medula óssea e desenvolveram a doença

do enxerto versus hospedeiro (Heney *et al.*, 1988). As melhoras causadas pelo uso da talidomida ao nível sistêmico, como a redução da febre e ganho de peso, fez com que a talidomida também fosse usada no tratamento da caquexia em pacientes positivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (James, 1995).

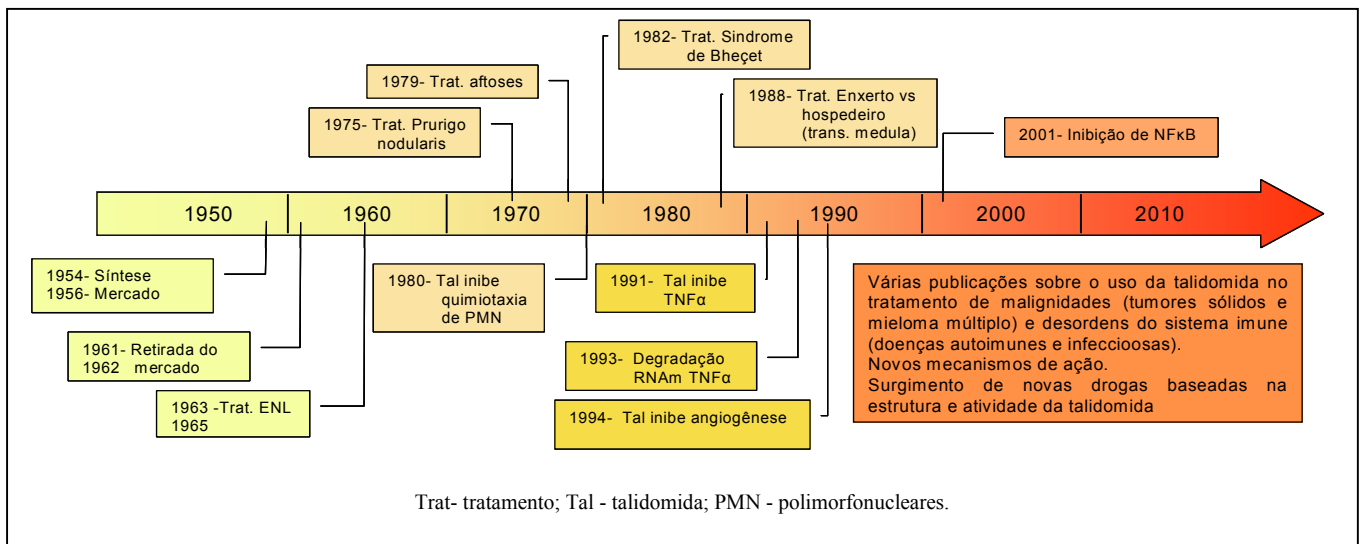


Figura – 5. Principais eventos da história da talidomida. De forma bem resumida são mostrados alguns dos principais eventos que levaram ao conhecimento da ação da talidomida e que em geral são citados na maioria dos trabalhos sobre esta droga (Botting, 2002; Calabrese *et al.*, 2000; Franks *et al.*, 2004; Keifer *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 1993; Moreira *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 1991; Sheskin, 1965; Sheskin, 1966).

A ação inibitória na angiogênese pela talidomida foi importante para a investigação sobre esta droga (D'Amato *et al.*, 1994). O uso da talidomida para tratamento de tumores já havia sido testado desde 1965; porém, o grande aumento de testes clínicos da talidomida na área oncológica surgiu com o seu efeito antiangiogênico (Thomas *et al.*, 2000). Foi demonstrado que a ação da talidomida se limita a alguns tipos de câncer, sendo o Sarcoma de Kaposi, câncer de próstata, melanomas e mieloma múltiplo onde ocorrem as melhores taxas de resposta à talidomida, mostrando que o efeito antiangiogênico e anti-tumoral depende dos fatores envolvidos em cada tipo de tumor (Franks *et al.*, 2004).

Hoje em dia as propriedades sedativas da talidomida são consideradas um dos seus efeitos colaterais, assim como a teratogenicidade e a neurotoxicidade periférica (Faver *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2003; Offidani *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 1996). A talidomida vem sendo utilizada com sucesso em doenças imunológicas e no câncer com base na imunomodulação e efeito antiangiogênico (Calabrese *et al.*, 2000; D'Amato *et al.*, 1994; Matthews *et al.*, 2003; Rajkumar, 2000). Apesar da sua eficiência comprovada nos estudos clínicos, novas moléculas baseadas na estrutura da talidomida vêm sendo estudadas com o objetivo de se conhecer os seus mecanismos de funcionamento e pela busca de novas drogas com características similares, porém com mecanismos de ação conhecido e com poucos efeitos colaterais (Corral *et al.*, 1999; Gutschow *et al.*, 2001; Kaplan, 2000; Lima *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2002; Wnendt *et al.*, 1996).

1.6. PROPRIEDADES QUÍMICAS DA TALIDOMIDA

A talidomida [(α ftalimida) glutarimida] é um pó branco inodoro e pouco solúvel em água ou etanol. A sua fórmula química é $C_{13}H_{10}N_2O_4$, o que lhe propicia uma massa molar de 258,2 g/mol. A molécula da talidomida é constituída de um anel ftalimida e um anel glutarimida. O anel glutarimida possui um carbono assimétrico, que fornece quiralidade à molécula. (Figura 6).

A talidomida possui propriedades antiinflamatórias e imunomodulatórias, o que está diretamente relacionado com sua habilidade de modular a produção de citocinas e as funções celulares. A administração da talidomida é feita por via oral e é utilizada a sua forma racêmica. A talidomida é pouco solúvel em água e a administração dos enantiômeros purificados é ineficiente por causa da rápida racemização *in vivo*. Estudos realizados para determinar a propriedade de cada enantiômero, utilizando análogos não racemizáveis, como

por exemplo, 3'-metiltalidomida, mostraram que o enantiômero-R parece estar associado aos efeitos sedativos enquanto que o enantiômero-S com os efeitos imunológicos e teratogênicos (Franks *et al.*, 2004).

Modificações na estrutura da talidomida levaram a diversos análogos com altos índices de inibição de TNF (Gutschow *et al.*, 2001; Shannon *et al.*, 1997). Dentre outros, amino-substituições no grupamento da ftalimida na posição 4, fenil-substituições no carbono 5' e compostos halogenados como a 4,5,6,7-tetrafluortalidomida e 3'-fluoro-talidomida. Também foi demonstrado que quando são feitas substituições na porção ftalimida de compostos N-alquil ftalimídicos, onde existem grupos doadores de elétrons para o sistema de ligações imida, ocorre um aumento na capacidade dessas moléculas em inibir a produção de TNF. Porém, a planaridade do anel ftalimida é necessária para esta inibição (Shannon *et al.*, 1997). A substituição do grupamento glutarimida por um anel fenílico causa a redução da atividade anti-TNF. Entretanto, a simples funcionalização na posição orto do anel fenila por grupos alquilas recupera a atividade biológica desejada, sendo posteriormente também demonstrado que substituições nas posições meta e para do anel fenila por grupos alquilas, contribui de forma similar para o aumento da atividade anti-TNF (McHugh *et al.*, 1997; Niwayama *et al.*, 1998).

A síntese de moléculas híbridas, que possuam o efeito da talidomida e de outros antiinflamatórios, parece ser uma alternativa possível na construção de análogos da talidomida, sendo a idéia principal remover partes da molécula responsáveis por alguns efeitos indesejados e agregando outras características de interesse terapêutico. A construção de moléculas formadas pelo anel ftalimida com a substituição do anel glutarimida por um radical inibidor da fosfodiesterase 4 vem se mostrando como uma boa estratégia, gerando resultados promissores em testes *in vitro* e em modelos animais (Lima *et al.*, 2002; Machado

et al., 2005; Moreira *et al.*, 2005). Alguns grupos sugerem ser o grupo glutarimida toxicofórico, enquanto que o ftalimida seria o farmacofórico. Sobre a porção ftalimida existe um consenso sobre este ser aquele que confere as propriedades terapêuticas, como a redução na produção de TNF. Há a sugestão de que a propriedade teratogênica seja devido à atividade da enzima prostaglandina H sintase (PHS) que iria agir sobre a talidomida gerando espécies radicalares na porção glutarimida. A inibição desta enzima por ácido acetil salicílico foi relacionada com a inibição da teratogênese *in vivo* (Arlen *et al.*, 1996).

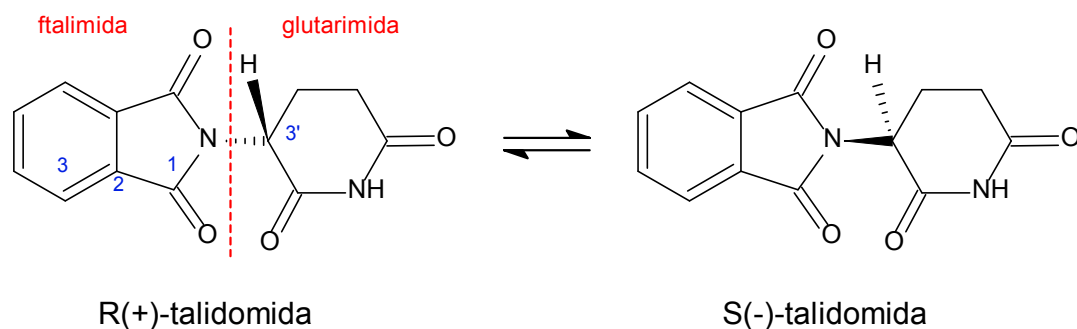


Figura-6. Representação estrutural da molécula da talidomida. A talidomida pode existir nas formas R ou S, dependendo da disposição das ligações em seu carbono assimétrico (3'). Em pH fisiológico a talidomida pode se interconverter entre as duas formas, sendo atribuídas à forma S as propriedades teratogênicas enquanto que a forma R as propriedades sedativas. A molécula da talidomida é constituída por um anel ftalimida e um anel glutarimida, sendo as propriedades farmacofóricas atribuídas ao primeiro anel.

Estudos com a 3'-metiltalidomida e 3'-fluorotalidomida, que são análogos não racemizáveis e enantioméricos, mostraram que as drogas com conformação S são aquelas que possuem maior inibição de TNF e são estruturalmente correlacionadas com a S-talidomida que é teratogênica (Chung *et al.*, 2003). Com o conhecimento adquirido sobre a talidomida até hoje fica cada vez mais fácil relacionar os seus efeitos benéficos com a teratogenicidade, como a redução na expressão de moléculas de adesão, redução na angiogênese e inibição de NF-κB que são eventos relacionados com o desenvolvimento. A teratogenicidade talvez seja um efeito difícil de ser abolido com a criação de novos análogos que possuam as mesmas atividades antiangiogênicas e anti-TNF. A principal intenção sobre o estudo de moléculas

análogas a talidomida deve se voltar para o aproveitamento de uma estrutura química capaz de gerar vários efeitos biológicos, onde já foi demonstrado por vários autores que modificações pontuais podem alterar o seu perfil de atuação. O estudo amplo dessas moléculas análogas pode gerar informações importantes para o entendimento da ação da talidomida e sobre possíveis novas moléculas com perfis imunomodulatórios distintos que poderão ser aplicados a específicas patologias dependendo do seu comprometimento imunológico.

Alguns autores acreditam que a talidomida seja capaz de intercalar moléculas de ácido desoxido ribonucléico (DNA), talvez por possuir similaridade com as bases purínicas (A- adenina e G- guanina). Experimentos *in vitro* mostraram que a talidomida se liga mais facilmente a guanina do que a adenina e não tem afinidade pelos outros nucleotídeos. Por isso acredita-se que a talidomida seja capaz de se intercalar ao DNA em regiões ricas em guanina, ligando-se também a regiões promotoras e bloqueando o acesso de fatores de transcrição. Cerca de 9% das regiões promotoras são regiões ricas em sequências de guanina (G) e citosina (C) GC e por isso a talidomida pode ter um efeito específico sobre as proteínas reguladas por este tipo de região. As proteínas fator de crescimento de fibroblastos (FGF)- 2 e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-I são mediadores da angiogênese e parecem estar envolvidos com o efeito da talidomida sobre regiões promotoras ricas em GC (Stephens *et al.*, 2000).

1.7. MECANISMO DE AÇÃO DA TALIDOMIDA

Apesar do grande interesse sobre a talidomida, havia uma lacuna sobre o mecanismo de ação desta droga. A partir da década de 90 esses dados começaram a surgir com o relato da

inibição da produção do TNF no soro dos pacientes com ENL tratados com talidomida e a consequente melhora do quadro clínico. O mesmo efeito também era visto *in vitro*: a talidomida reduzia a produção de TNF por monócitos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) e *M. leprae*, reduzindo a meia vida do RNAm para TNF de 30 para 17 minutos (Moreira *et al.*, 1993). Porém, o mecanismo pelo qual a talidomida causa essa redução da estabilidade do RNAm de TNF ainda não é conhecido.

A descrição sobre o efeito na produção de TNF não só serviu de base para a aplicação da talidomida em outras doenças também relacionadas à alta produção desta citocina, mas também foi usado como base para a liberação do uso da talidomida no ENL nos EUA (Sampaio *et al.*, 1991). Outras novas propriedades da talidomida foram descobertas subsequentemente, como a inibição da angiogênese e regulação de um importante fator de transcrição nuclear envolvido em eventos inflamatórios, o NF- κ B (D'Amato *et al.*, 1994; Keifer *et al.*, 2001). Vários efeitos biológicos da talidomida podem ser explicados por uma ação sobre o fator de transcrição nuclear NF- κ B, que está envolvido em vários fenômenos fisiológicos. Este fator é ativado por uma grande variedade de estímulos e desempenha um papel central em várias respostas celulares às alterações do meio ambiente, como a presença de patógenos e estresse oxidativo. NF- κ B ativa genes relacionados com a imunidade inata e inflamação como as citocinas (TNF α , IL-6, IL-12), proteínas envolvidas na apoptose (c-IAP2, FLICE, membros da família BCL-2) e fatores angiogênicos (VEGF, TNF α , IL8) (Majumdar *et al.*, 2002)

Por outro lado, a modulação de moléculas de adesão e outros fatores envolvidos com a angiogênese que contribuem para a sua efetividade em diversas desordens sugerem ser este um dos seus mecanismos de ação teratogênica. Na Figura 7 podemos ver de forma resumida os mecanismos de ação propostos para a talidomida. Dentre as atividades imunomodulatórias

da talidomida estão: i) a redução da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, o que diminui a transmigração de células do sangue para o tecido; ii) efeito anti ou pró-apoptótico dependendo da natureza do processo; iii) aumento da capacidade das células T em secretar IFN γ e IL-2, principalmente células CD8⁺, estimulando a proliferação, resposta citotóxica e produção de citocinas, sendo que é fundamental ter a sinalização via receptor de células T (TCR) para que a talidomida exiba este efeito co-estimulatório (Haslett *et al.*, 2003). Dentre esses processos no qual a talidomida é capaz de interferir, com certeza alguns deles estão relacionados com distúrbios de ordem maligna, entre eles síndromes mielodisplásicas, mieloma múltiplo e tumores sólidos, sendo atualmente uma das mais fortes linhas de pesquisa para a adoção da talidomida como agente terapêutico.

No mieloma múltiplo existem vários mecanismos responsáveis pela boa atuação da talidomida. Existe uma complexa rede de desregulação no micro ambiente da medula óssea, envolvendo o aumento da expressão de citocinas e fatores de crescimento (VEGF, bFGF), o que leva a ativação das células do estroma, aumenta a expressão de moléculas de adesão tais como o antígeno-1 associado à função leucocitária (LFA-1), molécula de adesão intracelular (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular (VCAM-1), e aumento da resposta das células do mieloma múltiplo aos contatos com a matriz extracelular e receptores das células do estroma levando à resistência a quimioterapia e a apoptose (Weber, 2003). Apesar da idéia inicial para o uso da talidomida no mieloma múltiplo ser pelas suas propriedades antiangiogênicas, não foi observado nenhuma correlação entre a redução da neovascularização da medula óssea com a resposta dos pacientes a talidomida. (Weber, 2003) O principal efeito da talidomida parece mesmo ser através da inibição da produção de citocinas e redução da expressão das moléculas

de adesão, o que reduziria a proliferação das células do mieloma múltiplo por reduzir a sua ativação e resistência a apoptose. A ação da talidomida parece acontecer também através da redução da expressão de ciclooxigenase (COX-2) pela diminuição no tempo de meia vida do seu RNAm, o que foi demonstrado em monócitos estimulados com LPS (Franks *et al.*, 2004). A COX-2 está envolvida em processos inflamatórios e ao contrário da COX-1 não é expressa constitutivamente, mas sim induzida por citocinas e fatores de crescimento. A redução da expressão da COX-2 pode implicar na redução da síntese de prostaglandinas (PG) G2 e H2 e outros autacóides relacionados, reduzindo vários eventos inflamatórios, desde febre até vasodilatação e recrutamento de leucócitos. A talidomida também pode modular a angiogênese através dessa via, uma vez que a alta expressão de COX-2 é encontrada em alguns cânceres humanos e é necessária para a angiogênese em um modelo que utiliza a córnea de ratos (Franks *et al.*, 2004). Alguns trabalhos mostram que a redução da expressão de COX-2 pode estar relacionada com NF- κ B, porém a indução de COX-2 não parece ser exclusivamente dependente da via de NF- κ B (Cherukuri *et al.*, 2005; Newton *et al.*, 2000; Slogoff *et al.*, 2004). Alterações na via de sinalização PTEN/AKT também foram recentemente descritas como mais um possível mecanismo de ação da talidomida, impedindo a degradação da proteína homóloga à fosfatase e tensina (PTEN) que age no citoplasma como um modulador negativo da ativação de Akt (também conhecida como proteína cinase B) (Knobloch *et al.*, 2008). Esses processos alterados pela talidomida estão também relacionados com distúrbios de ordem maligna, entre eles síndromes mielodisplásicas, mieloma múltiplo e

tumores sólidos, os quais estão sendo atualmente uma das mais fortes linhas de pesquisa para a adoção da talidomida como agente terapêutico.

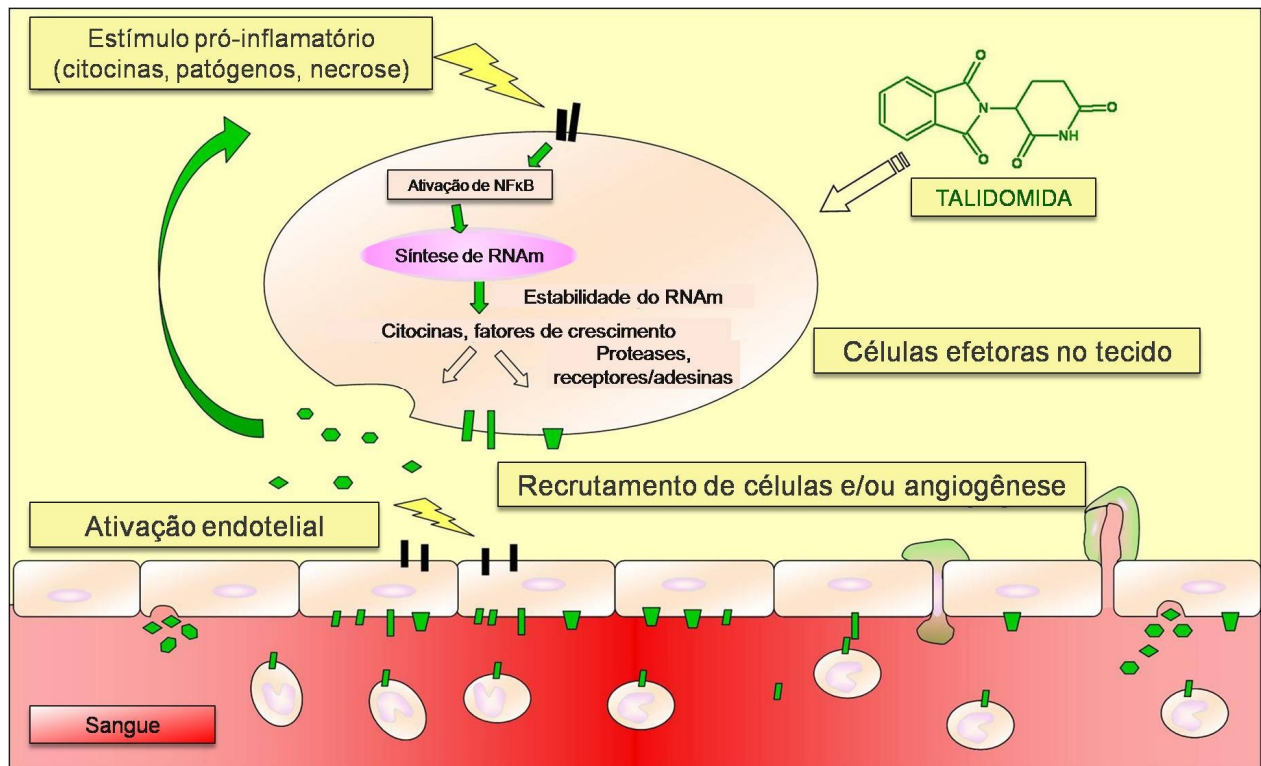


Figura-7. Mecanismos de ação da talidomida. Os pontos em verde demonstram os locais onde esta droga age em um microambiente pró-inflamatório. A ação dos estímulos pró-inflamatórios que levam a ativação das células no seu microambiente pode ser modulada negativamente pela talidomida. A redução da ativação de fatores de transcrição, tais como NF-κB, levam a uma menor produção destes fatores que poderiam agir autócrina ou paracrinamente. A expressão de receptores envolvidos na migração celular também é reduzida na presença da talidomida, tanto nas células endoteliais quanto nas células inflamatórias que chegam ao tecido inflamado. Fonte: adaptado de Sampaio, 2006 (Sampaio *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar o(s) mecanismo(s) de ação da talidomida na reação tipo II (ENL) em pacientes com hanseníase e testar *in vitro* a ação dos compostos análogos (LASSBio-468 e LASSBio-542) sobre parâmetros imunológicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar comparativamente a talidomida e os análogos LASSBio-468 e LASSBio-542 quanto a suas propriedades antiinflamatórias e antiangiogênicas;
- Verificar a expressão gênica de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no sangue periférico e em biópsias de lesões de ENL, antes e durante o tratamento com talidomida;
- Avaliar a ação da talidomida sobre a ativação de células endoteliais vasculares induzida por TNF;
- Determinar o potencial dos análogos da talidomida sobre a produção das citocinas TNF e IL-10, induzidas por LPS, em células mononucleares humanas;

3. METODOLOGIAS

3.1. POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram obtidas amostras de sangue periférico e das lesões de pacientes com hanseníase, diagnosticados e classificados de acordo com os critérios de Ridley e Jopling (1966), BL e LL que desenvolveram ENL atendidos no Ambulatório Souza Araújo (Laboratório de Hanseníase, FIOCRUZ, Rio de Janeiro). A coleta de sangue e biópsia foi feita conforme os padrões do Serviço Clínico e associada aos procedimentos de rotina do ambulatório para fins diagnóstico, no início da doença e durante o ENL, assim como durante o tratamento com talidomida (conforme protocolo 151/001, do Comitê de Ética em pesquisa da FIOCRUZ, após consentimento por escrito). Em alguns dos casos estudados a biópsia de lesão não reacional havia sido coletada no momento do diagnóstico para hanseníase, antes do início do tratamento com a poliquimioterapia.

3.2. BIÓPSIAS

As biópsias de pele de pacientes com a forma multibacilar da hanseníase, apresentando sintomas clássicos de ENL, conforme avaliação clínica pela equipe médica do Ambulatório Souza Araújo, foram coletadas no momento do diagnóstico e após sete dias de tratamento com talidomida (300mg/dia). As biópsias de pele das lesões reacionais e das lesões involuídas devido ao tratamento foram obtidas com um *punch* de 10 mm de diâmetro e mantidas em N₂ líquido até posterior uso. Para a obtenção do RNA, derme e epiderme foram processadas com 3ml de Trizol (Invitrogen, EUA) em um homogeneizador de tecidos (Polytron PT-3100 - Kinematica AG, Alemanha). As amostras foram divididas em 3 alíquotas de 1ml e estocadas à -

70°C por um período máximo de seis meses até ser submetida ao protocolo de extração de RNA.

3.3. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA

Para a obtenção do ácido ribonucléico (RNA) total, as amostras de células e biópsias em Trizol foram transferidas para microtubos livres de RNase. Foram adicionados 200µl de clorofórmio, seguido de homogeneização e incubação por 15 minutos em gelo. A mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo, contendo 600µl de isopropanol. As soluções foram agitadas até a homogeneização, mantidas à -20°C por no mínimo 30 minutos e centrifugadas a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C. O precipitado foi então lavado com 500µl de etanol 70%, submetido à nova centrifugação, e o RNA depois de seco foi ressuspensão em 15µl de H₂O.

Uma alíquota do RNA ressuspensão foi submetido à leitura em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 - Thermo Fisher, EUA) para quantificação. O RNA obtido teve sua integridade avaliada por eletroforese em gel desnaturante de agarose-formaldeído a 1,2%.

Para a transcrição reversa utilizamos alíquotas correspondendo a 1µg de RNA. Sendo a este material adicionado 1µl de oligo dT (500 ng/ml; Invitrogen). Após o volume final da reação ser completado para 10 µl com H₂O RF, as amostras foram então incubadas por 10 minutos a 65°C para o anelamento do oligo dT. Em seguida foi adicionado 1µl de RNAsin, inibidor de RNase, (40U/µl; Promega Biotech, EUA), 1µl de DNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP 0,2 mM cada; Applied Biosystems, EUA) com 4µl do tampão de transcrição 5X (Invitrogen), 2µl de ditioneitol (DTT 0,1M, Invitrogen) e 1µl de transcriptase reversa, Super

script II (200U/ μ l, Invitrogen). A reação de extensão foi realizada a uma temperatura de 42°C por 1 hora, seguido de aquecimento a 90°C por 10 minutos para a inativação da enzima. O volume das amostras foi elevado para 100 μ l com H₂O destilada e os tubos mantidos a -20°C até posterior uso nos ensaios de expressão gênica relativa.

3.4. RT-PCR EM TEMPO REAL

Para o PCR em tempo real, utilizamos cerca de 5 μ l do cDNA, preparado conforme descrito anteriormente, por reação. Para cada amostra foi adicionado 12,5 μ l de 2X TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) que contém AmpliTaq Gold 250U, AmpErase UNG, 10X Taqman Buffer A e dNTPs; 1,25 μ l do par de primers para o gene alvo e sondas conforme os códigos na tabela abaixo (Tabela 1) e o volume final corrigido para 25 μ l com água destilada estéril. Não utilizamos sistema multiplex de PCR em tempo real, sendo realizadas reações separadas para cada gene de interesse, sempre em paralelo a uma reação para o gene de controle endógeno GAPDH. A reação de polimerização foi realizada em uma máquina de PCR TaqMan (TaqMan ABI Prism® 7000, Applied Biosystems), com 1 ciclo a 50°C por 2 minutos, para a ativação da enzima AmpErase UNG, 1 ciclo a 95°C por 10 minutos para a ativação da AmpliTaq Gold DNA polimerase, e finalmente 50 ciclos contendo etapas de desnaturação a 95°C por 15 segundos e o anelamento e extensão em uma mesma etapa a 60°C por 1 minuto.

A detecção e análise dos resultados foram realizadas através do programa de detecção de seqüências amplificadas (ABI Prism® 7000 Sequence Detector). Para esta análise utilizamos o número de ciclo inicial (CT) de cada amostra para as moléculas de interesse sendo estabelecida uma diferença entre os CTs (Δ CT) das citocinas e controle endógeno GAPDH. Para obtenção dos valores de expressão gênica relativa utilizamos a equação $2^{-\Delta CT}$,

podendo ser exibido nesta tese sob a forma de logaritmo ou normalizado para porcentagem, quando não utilizaremos uma amostra calibradora. Nos experimentos que utilizamos uma amostra calibradora, o valor de CT desta foi subtraído de todas as outras obtendo os valores chamados de $\Delta\Delta CT$ e utilizamos a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$. As análises estatísticas específicas para cada caso serão mencionadas durante a descrição dos resultados, sendo feita com o programa Graph Pad Prism 4.0.

Gene Alvo	Repórter	Código do ensaio Taqman Applied Biosystems
GAPDH	VIC	4326317E
TNF	FAM	Hs00174128_m1
IL-10	FAM	Hs00174086_m1
CCR5	FAM	Hs00152917_m1
CCL-5	FAM	Hs00174575_m1
IFN γ	FAM	Hs00174143_m1
IL-2	FAM	Hs00174114_m1
TGF β 1	FAM	Hs00171257_m1
FOXP3	FAM	Hs00203958_m1
IL-1 β	FAM	Hs00174097_m1
COX-2	FAM	HS00153133_m1
VEGF-A	FAM	Hs00173626_m1
IL-8	FAM	Hs00174103_m1
MCP-1	FAM	Hs00234140_m1
IP-10	FAM	Hs00171042_m1
MIP-1 α	FAM	Hs00234142_m1

Tabela-1. Códigos para cada conjunto de primer e sonda específicos para cada gene conforme o fabricante (Applied Biosystems). Os ensaios podem ser consultados na página da internet do fabricante, indicando a região onde os primers e sonda se ligam, <http://www.appliedbiosystems.com>.

3.5. IMUNOHISTOQUÍMICA

As biópsias congeladas imediatamente após a sua coleta foram mantidas em nitrogênio líquido emblocadas em OCT (Sakura Tissue Tek - Holanda) até o momento do uso. As biópsias congeladas foram cortadas em fatias de 5µm de espessura seqüencialmente em criostato, acomodadas em lâminas de vidro para microscopia, secas com ar e fixadas em acetona gelada por 10 minutos. As seções foram incubadas com anticorpo primário para VEGF-A (Dako, Dinamarca) ou FVIII (Dako) por 60 minutos, então lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário biotilado seguido da incubação com o complexo avidina-peroxidase (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, EUA) e processadas de acordo com instruções do fabricante. Para revelação foi utilizado aminoethylcarbazol como substrato cromogênico. Nas lâminas controle, o anticorpo primário foi substituído pelo seu isotipo controle de especificidade irrelevante. As amostras foram analisadas em um microscópio (Nikon E400 Eclipse) e as imagens adquiridas e tratadas com o software ImagePro Plus.

3.6. TALIDOMIDA E ANÁLOGOS

Testamos em paralelo à talidomida novas moléculas que foram obtidas através da colaboração com o Dr. Eliezer J. Barreiro (Laboratório de Síntese e Avaliação de Substâncias Bioativas - LASSBio, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil), conforme mostrado na Tabela 2. As moléculas análogas à talidomida foram sintetizadas buscando modificações em relação à molécula original no grupamentos glutarimida (Machado *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2005).

Os compostos foram pesados em balança analítica e posteriormente diluídos em DMSO em concentrações de 100 a 200mM, seguido de diluições intermediárias. A concentração final das drogas na cultura foi de 15, 30 e 100µM no meio de cultura, a talidomida (Grunenthal -

Alemanha) foi utilizada em todos os experimentos como um parâmetro de comparação. Para controle negativo tratamos as células com a mesma quantidade de DMSO (0,1%) que foi aplicado nos poços tratados com as drogas.

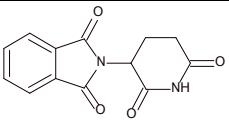
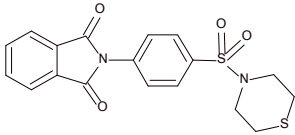
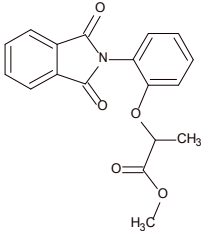
Nome	Estrutura	Observações
Talidomida		Molécula original, cuja estrutura serviu como base para a criação dos análogos. Será utilizada na forma racêmica em todos os experimentos, servindo como parâmetro base de atividade em relação às outras moléculas.
LASSBio-468		Análogo cujo grupamento ftalimidico foi preservado, sofrendo uma N-substituição por um grupamento 4-(fenilsulfonyl)-tior morfina ligado em sua posição <i>para</i> . Já foi testado em animais mostrando-se capaz de reduzir a indução de TNF (Lima <i>et al.</i> , 2002).
LASSBio-542		Molécula criada pela substituição da glutarimida por um grupamento metil 2-fenoxipropanoato ligado em sua posição <i>orto</i> . Já foi testada <i>in vivo</i> , possuindo atividade similar a talidomida sobre a produção de TNF α , porém um pouco mais efetivo que o composto LASSBio-468 (Machado <i>et al.</i> , 2005).

Tabela-2. Compostos testados. A estrutura química da talidomida e dos dois compostos testados nesse trabalho é mostrada, bem como uma breve descrição das alterações sofridas em relação à talidomida.

3.7. OBTENÇÃO DE PBMC E PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS CD4⁺

Obtivemos células mononucleares de sangue periférico de doadores sadios para os testes de atividade da talidomida e análogos, e também dos pacientes do nosso estudo para extração de RNA e acompanhamento da expressão gênica. A PBMC foi obtida através da centrifugação por gradiente do sangue diluído em solução salina sobre Ficoll-Hypaque (Invitrogen). O sangue dos pacientes foi obtido por punção venosa em seringa contendo heparina ou no caso de doadores normais, a partir de *buffy coat* obtido através de doações do

setor de hematologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil).

A viabilidade das células foi estimada por exclusão em azul de Tripán e a contagem feita em câmara de Neubauer. Cerca de 2×10^6 células foram utilizadas para extração de RNA. Para as culturas, 1×10^6 células foram cultivadas em placas de 24 poços a 37°C em estufa úmida com 5% de CO_2 por 24h em 1,0 ml de meio completo suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100U/ml penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 2mM de L-glutamina (Invitrogen) e estimuladas LPS 10ng/ml (Sigma Aldrich) sendo pré-tratadas com talidomida ou análogos a 30 μM . Os sobrenadantes provenientes das culturas foram utilizados em ensaios de ELISA para dosagem de citocinas.

Purificamos células T CD4^+ para os testes das propriedades da talidomida sobre a ativação de células T. As células foram purificadas através de um sistema de micropartículas metálicas associadas a anticorpos específicos para marcadores de superfície, no caso anti- CD4 , que são eluídas em uma coluna submetida a um campo magnético para retenção específica das células desejadas (Mylteni biotech). Seguindo as orientações do fabricante dos kits de separação celular, as colunas foram lavadas para liberação das células não ligadas. A remoção do campo magnético, seguido da eluição com tampão específico (PBS com 1% de soro fetal bovino e 0,5mM de EDTA) libera as células que podem ser obtidas com um alto grau de pureza. A ativação das células T CD4^+ foi feita em placas de culturas de 24 cavidades pré-tratadas com 500 μl de uma solução salina contendo 1 $\mu\text{g/ml}$ de anti- CD3 (R&D systems, EUA) por 2 horas a 37°C . Após lavagem da placa com solução salina pura, 1×10^3 células CD4^+ foram adicionadas na presença da talidomida (30 μM) ou não e incubadas por 24 horas

em estufa úmida com 5% de CO₂. Após a incubação prosseguimos para a extração de RNA das células.

3.8. CÉLULAS ENDOTELIAIS E ANGIOGÊNESE

A obtenção das células endoteliais de veias de cordão umbilical (HUVEC) foi feita pelo LabAngio - laboratório da angiogênese e biologia da célula endotelial do Departamento de biologia celular - UERJ, chefiado pela Dra Verônica Morandi. Estas células foram utilizadas para avaliação do potencial anti-angiogênico da talidomida e do análogo LASSBio-542, e foram obtidas através do tratamento de veias umbilicais humanas com uma solução estéril de colagenase IV 0,1% (Sigma - EUA) em PBS rico em glicose (Merck - EUA), conforme método descrito originalmente por Jaffe *et al* (1973). Com exceção do soro fetal bovino (SFB, Cutilab, Brasil) e do M199/HEPES (M199, Sigma), todos os suplementos da cultura de células são da Life Technologies do Brasil. As células primárias foram cultivadas em M199/HEPES suplementadas com 20% de SFB 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina, 2,5 µg/ml anfotericina e 100 µg/ml gentamicina. As HUVECs foram mantidas a 37⁰C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até atingirem a confluência, e então repicadas com tripsina-EDTA 0,025% e imediatamente usadas nos experimentos descritos neste capítulo.

Para testar o papel da talidomida e de seu análogo sobre a proliferação e viabilidade das HUVECs, 10x10³ células foram plaqueadas por 24 horas em placas de 96 poços, ainda não confluentes e posteriormente foram tratadas com a talidomida ou análogo nas concentrações de 10 e 30 µM durante 48 horas. A proliferação das células endoteliais foi medida através da técnica de MTS (Franklin *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). Uma curva padrão com células

plaqueadas na faixa de 1×10^3 a 20×10^3 células nas últimas 3 horas do experimento serviu para quantificação da densidade celular. A técnica é descrita em detalhes no item que trata dos testes de citotoxicidade.

Para verificação do potencial anti-angiogênico das drogas, foi necessário preparar as placas de cultura de 96 poços aplicando $30 \mu\text{L}$ de matrigel (B&D) gelado, seguido da incubação por pelo menos 30 minutos a 37°C para polimerização do matrigel. As células foram pré-incubadas por 30 minutos com a talidomida e o análogo 542 numa concentração de $30 \mu\text{M}$ ou somente com o solvente DMSO a 0,1%, sendo semeadas em duplicata sobre os poços contendo matrigel. Após 8 horas de serem semeadas (40×10^3 células por poço), as HUVEC, previamente tratadas com matrigel, se organizam formando estruturas tubulares compatíveis com o processo de angiogênese, podendo ser visualizadas em microscópio invertido (Nikon, Japão). A redução da formação dessas estruturas indica o potencial anti-angiogênico do composto testado.

Para avaliar se a talidomida e o análogo LASSBio-542 interferem na ativação de células endoteliais pela citocina pró-inflamatória TNF, pré-incubamos as células (5×10^5 por poço) semeadas há 24 horas em placas de 6 poços com a talidomida ou o análogo na concentração de $30 \mu\text{M}$. Após 30 minutos, foram adicionados 10 ng/ml de TNF recombinante humano (R&D systems) e as células foram incubadas por 3 horas. Após remoção do meio de cultura das placas, adicionamos 1 ml de trizol e transferimos para um microtubo livre de RNase para posterior extração de RNA, conforme descrito anteriormente.

3.9. ELISA

A avaliação do efeito da talidomida e seus análogos sobre a produção de citocinas *in vitro* pelas células no sobrenadante das culturas foi realizada por ELISA conforme orientações do fabricante do kit (R&D Systems).

Os sobrenadantes de PBMC foram diluídos na proporção de 1:5 com o diluente do kit para a dosagem de TNF, já que a curva padrão do kit cobria a faixa de 15,625 a 1.000 pg/ml e a quantidade máxima esperada não superava 5.000 pg/ml após estímulo com 10ng/ml com LPS. Para a dosagem de IL-10, os sobrenadantes foram diluídos na proporção de 1:2 com o diluente do kit, a faixa da curva padrão era de 31,25 a 2.000 pg/ml e a quantidade máxima esperada nas amostras não superava 4.000 pg/ml após estímulo com LPS.

A leitura das placas foi feita utilizando o leitor de ELISA SpectraMax 190 (Molecular Devices, EUA) e os dados analisados utilizando o software SoftMax Pro 4.0 (Molecular Devices). Devido às diferenças no potencial de produção de citocinas apresentado por cada doador, os resultados são exibidos no formato de percentual de produção de citocinas conforme normalização descrita nos resultados.

3.10. ATIVAÇÃO DE NF-κB

Para avaliar o efeito da talidomida e seus análogos na ativação de NF-κB pelo TNF, as PBMC (2×10^6 /ml) foram pré-incubadas por 30 minutos na presença das drogas na concentração de 30 μM, seguido do estímulo com 10ng/ml de TNF recombinante por mais 30 minutos até a extração de proteínas nucleares. Para evitar a aderência das células e facilitar a

transferência para tubos de forma rápida, estes experimentos foram feitos com as células incubadas em cubetas de teflon.

A extração de proteínas nucleares procedeu-se após lavagem das células com PBS gelado, centrifugando-as a 800 $\times g$ por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 400 μL de Tampão A (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1mM DTT, 0,5 mM PMSF). Os tubos foram gentilmente homogeneizados e incubados por 15 minutos em banho de gelo. Após o período de incubação, foram adicionados 25 μL da solução de Nonidet P-40 10% (NP-40) e os microtubos foram agitados vigorosamente durante 10 segundos. As células foram centrifugadas durante 1 minuto a 13000 $\times g$, ressuspensas em 50 μL de Tampão C (20 mM HEPES pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) e, em seguida, colocadas em plataforma de agitação a 4°C, por 15 minutos. Após esse período de agitação o extrato nuclear foi centrifugado a 13.000 $\times g$, durante 5 minutos, a 4°C e o sobrenadante obtido foi coletado e acondicionado em alíquotas a -80°C. Uma pequena alíquota destes extratos foi usada para dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

Para o ensaio de alteração de mobilidade eletroforética (EMSA, *electroforetic mobility shift assay*), incubamos 10 μg do extrato de proteínas nucleares obtido com a sonda consenso para NF- κ B e 2 μg de poli dI-dC em 25 μl de tampão de ligação [10 mM Tris HCl (pH 7.5), 75mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM EDTA, 12.5% glicerol e 0.1% (vol x vol) Triton-X 100], à temperatura ambiente por 30min. Utilizamos cerca de 40 μCi da sonda consenso para NF- κ B (5'- GGGACTTTCC -3'), marcada radioativamente com P³². Após 30 min acrescentamos 2,5 μl de tampão de carregamento [250mM Tris-HCl (pH 7,5), 0.2% azul de bromofenol, 0.2% xileno cianol e 40% glicerol] e as amostras foram analisadas por

eletroforese em gel de poliacrilamida a 4% não desnaturante. A visualização das bandas foi feita por autoradiografia.

3.11. CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO

No intuito de investigar o potencial citotóxico da talidomida e seus análogos sob PBMC e HUVEC foi utilizado o teste MTS (Promega). As células viáveis metabolizam o MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximethoxyphenil)-2-(4-sulfophenil)-2H-tetrazólio), que na presença de metossulfato de fenazina (PMS) produz um produto solúvel em água – formazan – que possui absorvância máxima em 490-500 nm em PBS. Os ensaios foram realizados em placas de 96 cavidades, onde as células plaqueadas em um volume final de 100µl de meio de cultura, na presença ou ausência das drogas em várias concentrações. As células foram mantidas em cultura nas mesmas condições dos outros experimentos por 48 horas. O meio de cultura foi então trocado (para evitar possível interferência das drogas com a leitura espectrofotométrica posterior) por meio de cultura RPMI-1640 para PBMC ou MCDB-131 para HUVEC, ambos sem soro e antibióticos acrescidos de 10% da solução de MTS, incubado por mais 3 horas e lido em um aparelho leitor de ELISA a 490 nm. Uma curva padrão de 10×10^3 a 50×10^3 células por poço também foi feita para ajudar a interpretar os resultados de proliferação celular.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos dois testes diferentes para cada situação estudada neste trabalho, as diferenças estatísticas foram verificadas utilizando o software GraphPad Prism versão 4.0 (Graph Pad software, EUA). Para testar a diferença entre a expressão gênica dos grupos de biópsias em duas situações diferentes (diagnóstico x reação ou reação x tratamento),

utilizamos o teste pareado não paramétrico *Wilcoxon signed rank test* considerando significativos valores de $p < 0,05$. Nos demais experimentos *in vitro*, a diferença entre os percentuais de expressão gênica, de produção de citocinas ou ativação de NF- κ B mediante os diferentes tratamentos foram testadas contra o valor hipotético de 100% através do teste *One sample t test*, considerando significativo o valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. EXPRESSÃO GÊNICA EM LESÕES DE ENL APÓS TRATAMENTO COM TALIDOMIDA

Um total de oito pacientes do sexo masculino que desenvolveram o quadro de ENL, tratados com talidomida e acompanhados no ambulatório Souza Araújo - FIOCRUZ-RJ foram avaliados. Em todos os casos estudados, acompanhamos o intercurso de reação e tratamento durante o primeiro quadro de ENL apresentado por cada paciente.

O diagnóstico do ENL foi realizado através da avaliação clínica dos pacientes e posteriormente confirmado por análise histopatológica. Por se tratar de uma emergência médica, o tratamento com Talidomida foi iniciado baseado apenas no diagnóstico clínico. Os sintomas sistêmicos, o mal estar geral do paciente associado ao diagnóstico prévio de hanseníase multibacilar e as lesões na pele características do ENL são indicativos para o início do tratamento. No entanto, os casos nos quais o ENL não foi confirmado por análise histopatológica foram descartados deste estudo. As biópsias das lesões de pele foram coletadas no dia do diagnóstico clínico e após uma semana de tratamento com talidomida. Em todos os casos os pacientes receberam 300mg por dia de talidomida, o tempo de tratamento até a remissão completa dos sintomas se estendeu por mais de um mês em todos os casos. A maioria dos pacientes desenvolveu pelo menos mais de um episódio reacional, havendo a necessidade, em alguns casos, de receber novos ciclos de tratamento com talidomida e o uso de prednisona. Na tabela a seguir são mostradas de forma resumida as características de cada caso estudado, no momento do diagnóstico e após tratamento (Tabela 3).

Após a obtenção das biópsias, estas foram congeladas em nitrogênio líquido até o momento onde foram processadas em Trizol para extração de RNA e subsequente síntese de

cDNA. Avaliamos por PCR em tempo real, através do sistema “Taqman” a expressão de diversos genes relacionados ao sistema imune. Porém, esta análise não pôde ser realizada de forma completa em todos os casos em virtude da limitação de material obtido. Os resultados são expressos na forma do logaritmo da razão entre os valores de $2^{-\Delta CT}$ obtido na biópsia após e antes do tratamento. Os genes cuja expressão foi avaliada sinalizavam para:

- i) Citocinas - IL-10, IL-1 β , IL-2, VEGF-A, fator de crescimento transformante (TGF) β , TNF e IFN γ ;
- ii) Quimocinas - quimiocina regulada por ativação expressa e secretada por células T normais RANTES/CCL5, IL-8, proteína de 10kDa induzível por IFN γ (IP-10/CXCL-10), proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 α /CCL3), proteína quimiotática de macrófago (MCP-1/CCL2) e o receptor - CCR5;
- iii) Enzima COX-2, envolvida com a síntese de prostaglandinas;
- iv) Fator de transcrição característico de células T regulatórias - *forkhead box p3* (Foxp3).

De uma forma geral, foi observado que 3 genes sofreram alterações significativas após tratamento com talidomida: *IL10*, *TNF* e *CCR5*. A interleucina-10 (IL-10) é reconhecida pelas suas propriedades antiinflamatórias por inibir a ativação e função efetora de células T, monócitos, macrófagos e células dendríticas. As principais fontes de IL-10 são os macrófagos e as células Th2. Atualmente a ação da IL-10 sobre a diferenciação e regulação da atividade das células T reguladoras é bastante discutida. A atividade da talidomida sobre a produção de IL-10 já foi descrita por alguns grupos, mostrando a sua capacidade de aumentar a produção desta citocina (Calabrese *et al.*, 2000). Analisando as biópsias de lesões de pele nos pacientes

após tratamento com talidomida verificamos um aumento na expressão do RNAm para IL-10 em 7 dos 7 casos avaliados (*Wilcoxon signed rank test* $p < 0,05$) (Figura 8).

Paciente	Forma clínica	Idade	Dose PQT	Início dos Sintomas	Sintomas - Reação / Tratamento					
					Sistêmico	Lesões	Mal-estar geral	Febre	Edema*	Outros
1	LL	30	8 ^a	25 dias	+ / -	ativas / involuídas	+ / -	+ / -	- / -	Queixas visuais + / -
2	LL	45	2m pós-alta	5 dias	- / -	ativas / involuídas	- / -	- / -	+ / -	Parestesia + / -
3	LL	30	0	Não relatado	+ / -	ativas / involuídas	+ / -	+ / -	- / -	Parestesia + / + Artralgia + / -
4	LL	33	0	2 anos	+ / -	ativas / involuídas	+ / -	+ / -	- / -	Parestesia + / - Artralgia + / - Adenomegalia + / -
5	LL	30	2 ^a	Não relatado	+ / -	ativas / involuídas	+ / -	+ / -	- / -	Parestesia + / - Artralgia + / - Orquite + / - Adenomegalia + / -
6	LL	28	5 ^a	7 dias	+ / + **	ativas / involuídas	+ / +	+ / +	+ / +	Parestesia + / + Artralgia + / + Orquite + / - Adenomegalia + / +
7	LL	22	3m pós alta	2 meses	+ / -	ativas / involuídas	- / -	- / -	- / -	Adenomegalia + / -
8	BL	33	9 ^a	7 dias	+ / + **	ativas / involuídas	+ / +	+ / -	+ / +	Queixas visuais + / - Adenomegalia + / -

Tabela 3. Resumo clínico dos pacientes estudados. Todos os casos de ENL foram confirmados através de análise histopatológica das biópsias. O sinal “+” indica a presença do sintoma e o sinal “-” indica a sua ausência, sendo que a barra separa os momentos antes e após o tratamento. Todos os pacientes eram do sexo masculino, foram avaliados clinicamente no momento do diagnóstico e após uma semana de tratamento com 300 mg/dia de talidomida. As lesões reacionais se apresentam em forma de nódulos doloridos. A redução dos nódulos e da dor é indicativa de melhora das lesões. * O tipo de edema citado na tabela não compreende edema sistêmico, nestes casos o edema se apresenta principalmente nos membros periféricos e grandes articulações. ** Este paciente alcançou melhora dos sintomas de forma lenta, e obteve a remissão completa após 30 dias de tratamento com talidomida. PQT- poliquimioterapia para multibacilares.

Em 7 dos 8 casos testados, a expressão do gene para TNF mostrou-se aumentada nas biópsias de lesão após uma semana de tratamento com talidomida, sendo estatisticamente significativo (*Wilcoxon signed rank test* $p < 0,05$) (Figura 8). Trabalhos do nosso próprio grupo já demonstraram a importância do TNF no ENL, inclusive a redução da sua expressão em biópsias de pele após tratamento com talidomida (Moraes *et al.*, 2000); contudo, algumas

diferenças entre as metodologias aplicadas devem ser levadas em conta, uma vez que neste outro trabalho somente a parte da derme de 3 casos foi testado por RT-PCR convencional. Outros grupos já demonstraram que a talidomida é capaz de levar ao aumento na produção de TNF em outros modelos, como no caso de sangue total estimulado por LPS ou na co-estimulação de células T CD8⁺ (Haslett *et al.*, 2005), podendo justificar este aumento na expressão de TNF na maioria dos casos.

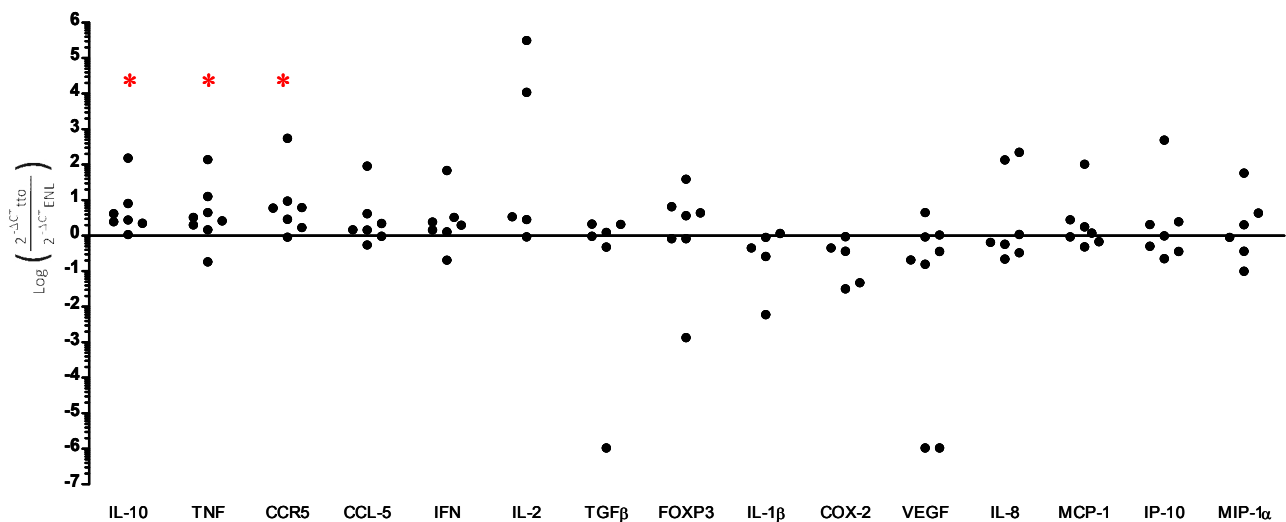


Figura-8. Razão entre os níveis de expressão gênica nas biópsias após 7 dias de tratamento com talidomida 300mg/dia e no momento do diagnóstico do ENL. Os pontos acima do eixo x indicam uma expressão gênica maior após o tratamento. Os resultados foram obtidos por PCR em tempo real, utilizando conjuntos de primers e sondas desenhados para o sistema Taqman. O gene endógeno utilizado nos testes foi o *GAPDH*, e os níveis de expressão gênica foram obtidos pela equação $2^{-\Delta CT}$ sendo os resultados expressos como logaritmo da razão. (* *Wilcoxon signed rank test*, $p < 0,05$).

Outro gene que se mostrou aumentado nas lesões dos pacientes tratados com talidomida por uma semana foi o receptor de quimiocina CCR5. Em 6 dos 7 casos estudados, verificamos maiores níveis de expressão para o seu RNAm (*Wilcoxon signed rank test* $p < 0,05$). Este receptor é expresso em células T não ativadas, nas de memória e também nas efetoras, sendo que os monócitos, macrófagos e células dendríticas imaturas também apresentam a expressão desse receptor (Appay *et al.*, 2001; Geginat *et al.*, 2001; Sallusto *et al.*, 1999). As principais quimiocinas ligantes de CCR5 são: MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 e RANTES/CCL5 (Hancock *et al.*, 2003; Loetscher *et al.*, 1998). Embora a expressão de CCR5

em células T esteja relacionada com a migração de células para sítios de inflamação, como no caso da artrite reumatóide (Hancock *et al.*, 2003; Loetscher *et al.*, 1998), onde diversos dos seus ligantes estão presentes em altos níveis, também está relacionado com a migração de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ para locais onde há uma supressão da resposta imune efetora (Kallikourdis *et al.*, 2007; Yurchenko *et al.*, 2006). A quimiocina CCL-5, também conhecida como RANTES, que é um dos principais ligantes de CCR5 também foi avaliada em nossos estudos, estando aumentada em 5 dos 7 casos avaliados (Figura 8).

Em 6 dos 7 casos avaliados, foram detectados níveis maiores de expressão gênica de IFN γ nas biópsias após tratamento com talidomida. O IFN γ é produzido principalmente por células T CD4⁺, CD8⁺ e NK ativadas, possuindo a capacidade de ativar células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos e células dendríticas. Contudo, a sua participação é importante no processo de diferenciação de células T reguladoras, dependendo do contexto em que ele é produzido e da presença de outras citocinas, tais como TGF β e IL-2 que também foram avaliadas (Fontenot *et al.*, 2005a). Em 4 dos 5 casos avaliados, a expressão de IL-2 foi encontrada aumentada após uma semana de tratamento com talidomida, sendo que em dois casos os níveis durante o ENL eram indetectáveis. Os níveis de expressão para a citocina TGF β foram maiores em 3 dos 6 casos avaliados, sendo que em 1 caso sua expressão não foi detectada nem antes nem após tratamento e em outros dois observamos uma redução (Figura 8).

A expressão do fator de transcrição Foxp3, característico das células T reguladoras, foi encontrado aumentado em 4 das 7 amostras testadas, sendo que em um dos casos o nível de expressão de Foxp3 após o tratamento foi indetectável. Aparentemente, o Foxp3 age estabelecendo e mantendo o programa genético da célula T regulatória (Treg), funciona como um regulador negativo da ativação de células T e talvez como “efetor” transcricional de

programas de citocinas anti-inflamatórias (Fontenot *et al.*, 2005b). A indução da sua expressão é dependente de IL-2, TGF β , IFN γ , entre outras e a identificação da sua expressão em células CD4⁺ que também estejam expressando altos níveis de CD25 é útil para a caracterização de células T regulatórias (Fontenot *et al.*, 2005b).

Dentre os genes que nós estudamos verificamos que alguns deles tiveram sua expressão reduzida nas lesões após o tratamento com a talidomida. A citocina pró-inflamatória IL-1 β compartilha diversas funções com o TNF, tais como ativação de células endoteliais e linfócitos, embora não seja estruturalmente correlacionada. Em 4 das 5 biópsias estudadas pós tratamento com talidomida a expressão da IL-1 β estava menor do que no momento da reação, o que demonstra que a talidomida exerce realmente uma ação antiinflamatória embora não observássemos redução na expressão de *TNF* (Figura 8).

Outro marcador inflamatório incluído em nosso estudo, o qual sua modulação negativa pela talidomida já era conhecida, foi a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), responsável pela síntese de prostaglandinas e que também está envolvida com a angiogênese de tumores. Em todos os 5 casos avaliados a expressão de *COX2* estava reduzida após uso da talidomida. A citocina VEGF-A, que é capaz de levar à ativação endotelial e está correlacionada com a angiogênese também foi avaliada nas biópsias. Dos 8 casos avaliados para a expressão de *VEGFA*, 2 deles não apresentaram alteração tanto antes como após o tratamento e em 5 casos observamos a redução com o uso da talidomida (2 casos com uma leve redução) e 1 aumentou.

A expressão de algumas quimiocinas nas biópsias também foi avaliada, tentando entender se a redução de algumas delas poderia estar correlacionada com a remissão dos sintomas do ENL. Dentre as quimiocinas estudadas, não observamos nenhuma alteração que fosse uniforme na maioria dos casos, embora não perca o seu significado biológico. A

expressão da quimiocina IL-8, que pode ser produzida por uma enorme variedade de células (monócitos, linfócitos, células do endotélio ou epitélio e fibroblastos) sendo um potente ativador de neutrófilos e possui atividade pró-angiogênica, bem como a expressão da quimiocina MCP-1, que é um potente fator quimiotático dos macrófagos, foram avaliadas. Em 4 dos 7 casos avaliados, a expressão de IL-8 foi reduzida, já a expressão de MCP-1 esteve reduzida em 3 dos 7 casos. As quimiocinas IP-10 e MIP-1 α também foram avaliadas, reduzindo em 4 de 7 e 3 de 6 casos, respectivamente. A IP-10 é induzida por IFN γ , produzida por células endoteliais, fibroblastos e macrófagos. Age atraindo e ativando macrófagos, células endoteliais, células dendríticas, células T e NK. A MCP-1 α é produzida por vários tipos celulares e na pele pode ter as mesmas fontes que a IP-10. A sua atividade quimioatratora é bastante seletiva para monócitos e não age sobre neutrófilos.

Após esta análise geral dos resultados o perfil clínico de cada paciente foi avaliado (Tabela 3). O paciente 1 apresentou um quadro de sintomas sistêmicos, porém não muito acentuados, apresentando principalmente febre e mal-estar geral por 25 dias que regrediram após o uso da talidomida. Os nódulos cutâneos decorrentes do episódio reacional deixaram de ser doloridos e reduziram de tamanho após o tratamento. Conforme visto na Figura 9, após o tratamento com talidomida verificamos haver um aumento na expressão de IL-10, TNF, CCR5, CCL5, IFN, IL-8, MCP-1, IP-10 e MIP-1 α . Neste caso não testamos a expressão de IL-2, TGF β e COX-2. Verificamos uma redução na expressão de Foxp-3 e VEGF-A na biópsia após tratamento. Neste paciente não testamos a expressão gênica na PBMC.

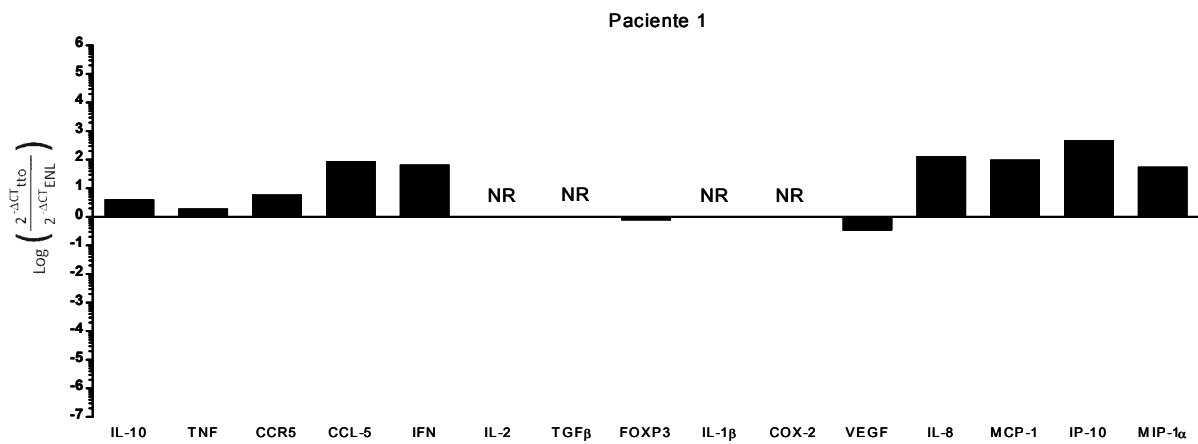


Figura-9. Perfil de expressão gênica das biópsias de pele do paciente 1 após tratamento com talidomida em comparação às biópsias obtidas no diagnóstico da reação.

O paciente 2 praticamente não apresentou sintomas sistêmicos, apresentando-se ao serviço médico após 5 dias do início do aparecimento dos nódulos doloridos pelo corpo. Foi verificado na avaliação clínica que o mesmo apresentava parestesia nos pés e edema nas mãos e nos pés. A parestesia é um indicativo de comprometimento de nervos periféricos devido à inflamação e neste caso deve ser encarado como uma emergência médica já que este tipo de comprometimento pode levar a incapacitação do indivíduo mesmo sem apresentar os sintomas sistêmicos clássicos. Este paciente respondeu prontamente ao tratamento com 300 mg/dia de talidomida, obtendo a regressão das lesões e remissão dos outros sintomas em uma semana, no entanto voltou a apresentar por várias vezes sintomas semelhantes após a interrupção da talidomida. Usualmente a talidomida passa a ser administrada em doses menores após um mês de tratamento, quando há remissão dos sintomas, usualmente 100 mg/dia por mais duas semanas e a mesma dose em dias alternados por mais duas semanas. Verificando a expressão gênica nas biópsias desse paciente, observou-se um aumento na expressão dos genes para IL-10, TNF, CCR5, IFN γ , TGF- β , Foxp-3 e MCP-1. O fator de crescimento VEGF e a quimiocina IP-10 apresentaram uma expressão gênica menor após o tratamento, porém em pequena extensão e a quimiocina IL-8 manteve sua expressão praticamente inalterada (Figura 10A). Neste paciente também analisamos a expressão gênica nas PBMC isoladas. Verificamos então que a expressão de IL-10, IL-2 e Foxp3 estavam maiores após o

tratamento, e a expressão de TNF e IFN γ apresentaram-se menores nas células mononucleares do sangue desse paciente (Figura 10B).

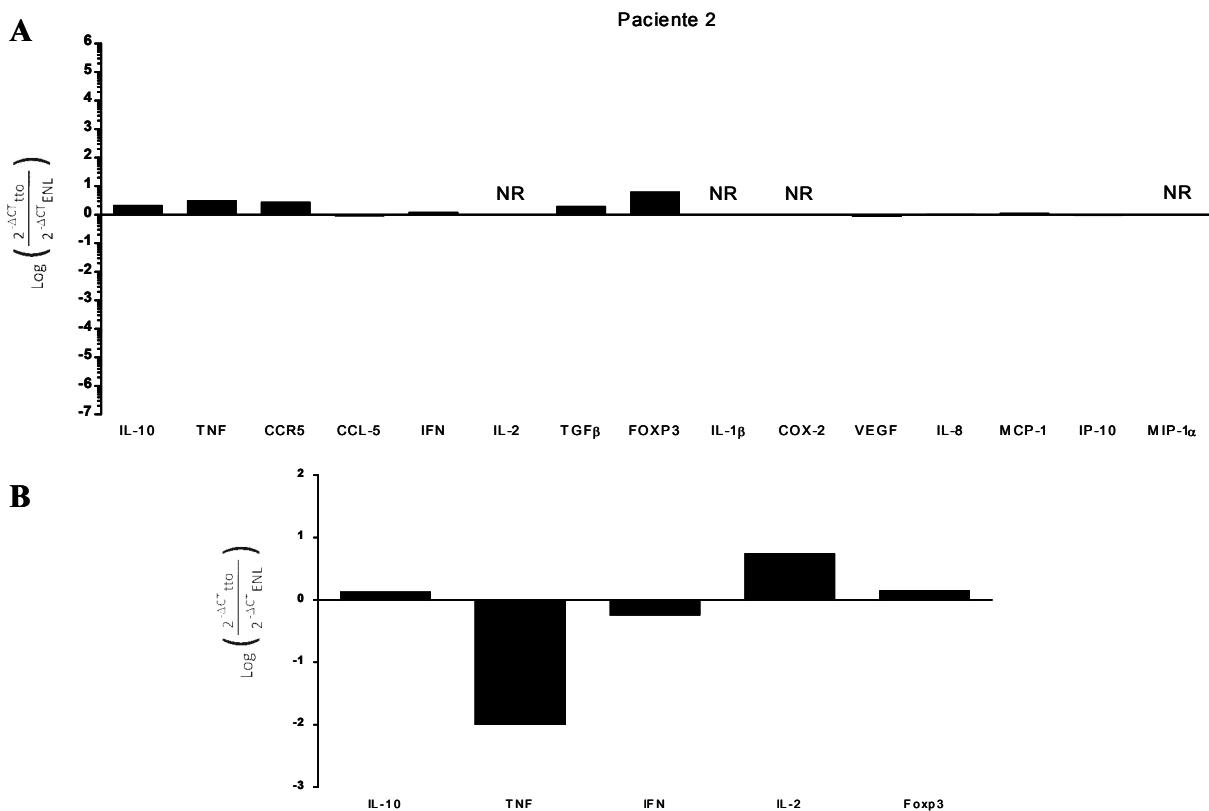


Figura 10. Perfil de expressão gênica do paciente 2 após tratamento com talidomida em comparação ao momento do diagnóstico da reação. A- expressão gênica nas biópsias. B- expressão gênica nas PBMC recém isoladas.

O paciente 3 apresentou-se ao serviço médico do ambulatório Souza Araújo quando foram verificados sintomas relacionados ao ENL, tais como mal-estar geral, febre, artralgia, parestesia e nódulos doloridos pelo corpo, principalmente nos membros superiores e inferiores. Este paciente ainda não havia recebido o diagnóstico para hanseníase, não tendo ainda recebido o tratamento específico. Após a confirmação do diagnóstico para hanseníase e da reação do tipo II, este paciente começou a receber o tratamento poliquimioterápico e talidomida a 300 mg/dia. Os sintomas sistêmicos regrediram logo após início do tratamento com talidomida, sendo as lesões reacionais involuídas após uma semana. O único sintoma que ainda se manteve foi a parestesia, inclusive após um mês de tratamento com talidomida, provavelmente devido já a alguma lesão mais séria dos nervos periféricos. Durante a

poliquimioterapia o paciente voltou a apresentar novos quadros de ENL. O perfil de expressão gênica analisado nas biópsias, antes e após o tratamento, indicou aumento da expressão para TNF, IFN γ , IL-2, TGF β , FOXP3, IP-10 e MIP-1 α . A expressão de IL-10 ficou praticamente inalterada, sofrendo um leve aumento. Os genes para CCR5, CCL5, IL-1 β , COX-2, VEGF-A, IL-8 e MCP-1 estiveram menores após uma semana de uso de talidomida nas biópsias de lesões em regressão (Figura 11A). Na PBMC deste paciente encontramos o aumento para IL-10, TNF, IFN γ , IL-2 e Foxp3 (Figura 11B).

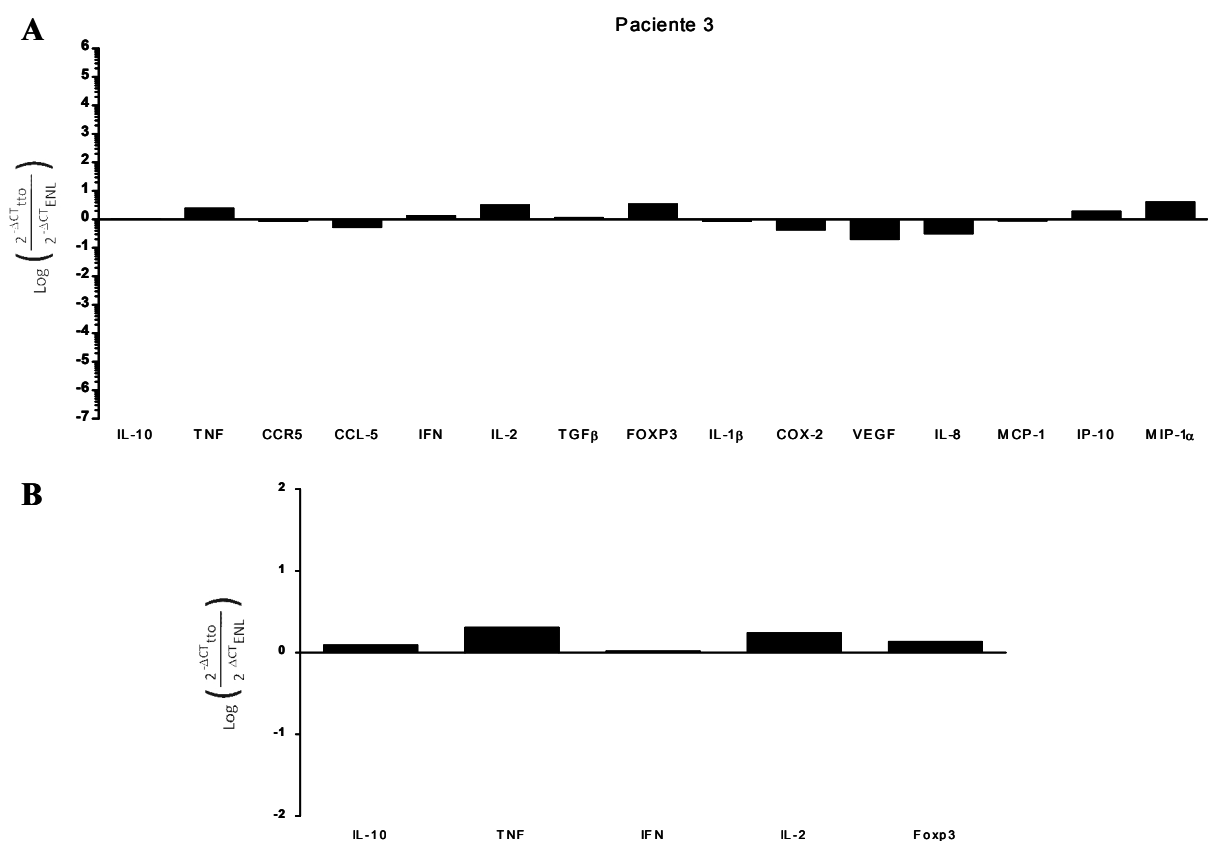


Figura 11. Perfil de expressão gênica do paciente 3 após tratamento com talidomida em comparação ao momento do diagnóstico da reação. A- expressão gênica nas biópsias. B- expressão gênica nas PBMC recém isoladas.

O quarto paciente analisado, também ainda não havia começado o tratamento poliquimioterápico antes de apresentar o sintoma de reação, sendo que relata ter sintomas correlacionados ao episódio reacional a cerca de 2 anos. Os sintomas verificados pelo serviço médico foram febre, mal-estar geral, artralgia, adenomegalia, parestesia e nódulos doloridos por diversas partes do corpo. As lesões nodulares regrediram com uma semana do tratamento

com talidomida, bem como todos os outros sintomas relatados. Após o início do tratamento específico para hanseníase multibacilar este paciente voltou a apresentar novos quadros de ENL. Este paciente, após o tratamento, apresentou na biópsia em regressão aumento na expressão dos genes para IL-10, TNF, CCR5 e CCL5. Observamos uma expressiva redução na expressão gênica para VEGF-A acompanhada da redução na expressão de IFN γ , IL-2, TGF β , Foxp3, IL-1 β , COX-2, IL-8, MCP-1, IP-10 e MIP-1 α após o tratamento (Figura 12A). Nas PBMC deste paciente verificamos a redução na expressão para IL-10 e aumento na expressão para TNF, IFN γ , IL-2 e Foxp3 (Figura 12B).

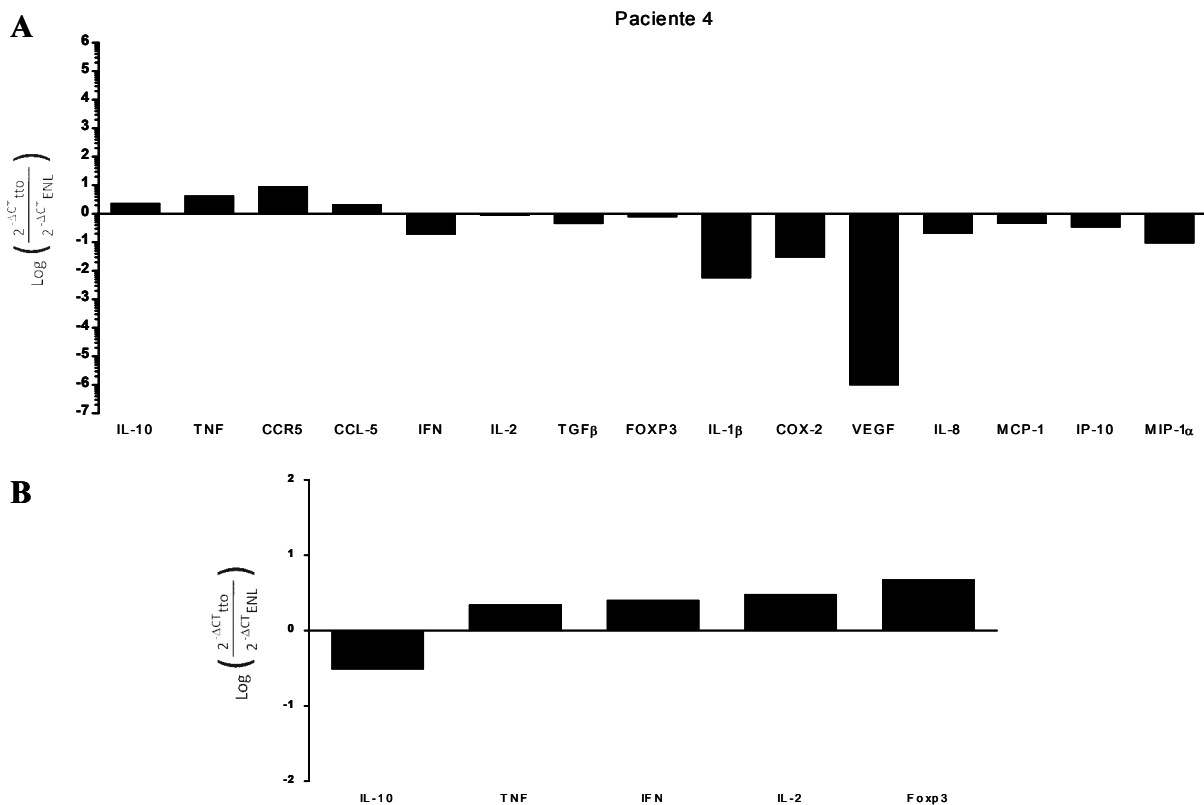


Figura 12. Perfil de expressão gênica do paciente 4 após tratamento com talidomida em comparação ao momento do diagnóstico da reação. A- expressão gênica nas biópsias. B- Expressão gênica nas PBMC recém isoladas.

Durante a avaliação clínica do paciente 5 que apresentou sintomas reacionais após a quinta dose de PQT, foi constatado que além das lesões nodulares eritematosas dolorosas clássicas do ENL, o paciente apresentava mal-estar geral, febre, parestesia, artralgia, adenomegalia e orquite. A avaliação clínica após uma semana de tratamento com a talidomida demonstrou que houve uma remissão dos sintomas, incluindo a regressão da orquite (quadro

de inflamação testicular, que pode levar a esterilidade do paciente) e das lesões de pele que se apresentaram involuídas, sem aparecimento de novas lesões. A análise da expressão gênica nas biópsias demonstrou que após o tratamento foram encontrados níveis maiores na expressão dos genes para IL-10, TNF, CCR5, CCL5, IFN γ , IL-2, Foxp3 e das quimiocinas MCP-1, IP-10 e MIP-1 α (Figura 13A). A expressão de IL-2 não foi detectada na biópsia reacional sem tratamento, sendo utilizado um valor de expressão arbitrário (menor do que o obtido em todas as análises) para poder fazer a relação entre antes e depois do tratamento de forma que ficasse indicado no gráfico que houve um aumento. A expressão gênica para TGF β , IL-1 β , COX-2 e IL-8 apresentavam-se em menores níveis após o tratamento com talidomida, enquanto que para VEGF-A foi detectada uma redução praticamente imperceptível. Nas PBMC verificamos aumento na expressão gênica para IFN γ , IL-2 e Foxp3 seguido de redução na expressão para TNF e IL-10 após o tratamento (Figura 13B).

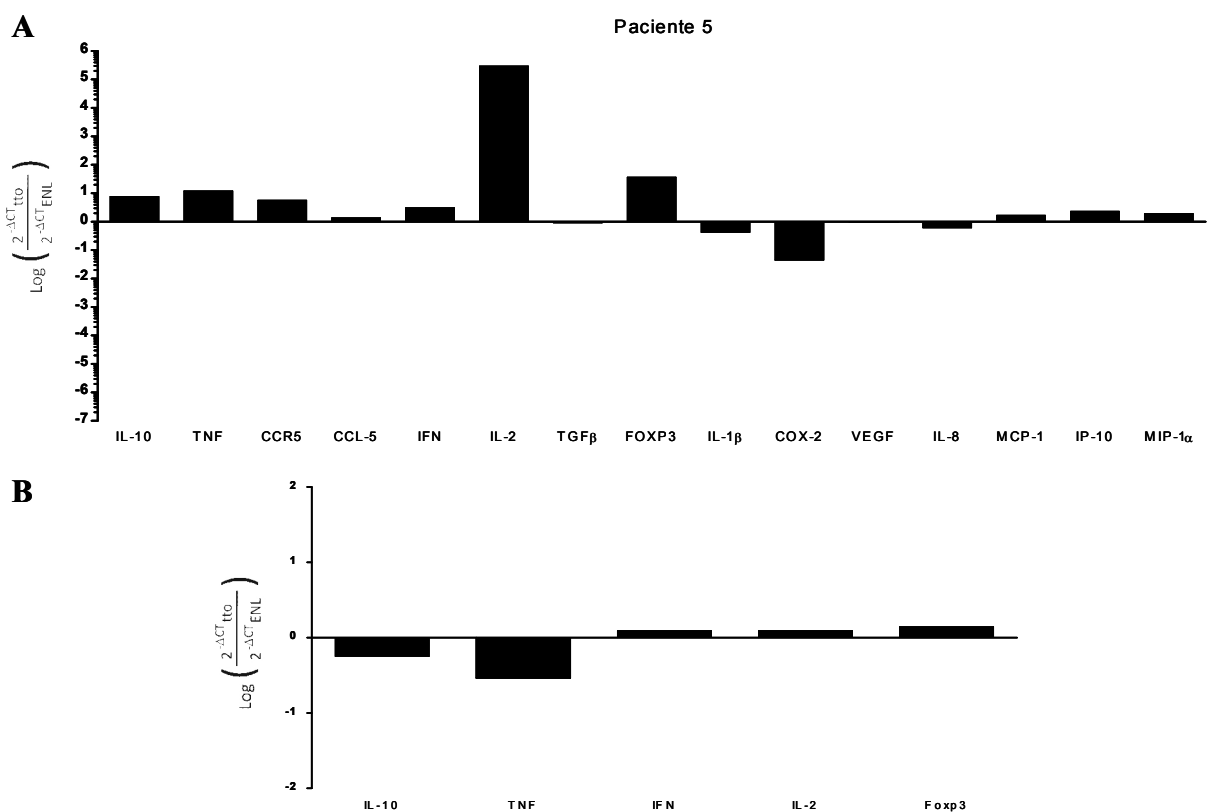


Figura 13. Perfil de expressão gênica do paciente 5 após tratamento com talidomida em comparação ao momento do diagnóstico da reação. A- expressão gênica nas biópsias. B- expressão gênica nas PBMC recém isoladas.

Dos casos estudados dois não sofreram uma remissão completa dos sintomas sistêmicos após uma semana de tratamento com talidomida - os casos 6 e 8. O caso 6 apresentou maiores complicações sistêmicas, sendo o único em que houve a necessidade de internação durante o tratamento; porém, o uso da talidomida não deixou de ser eficaz apesar da resposta lenta que possivelmente ocorreu devido a forma aguda em que o quadro reacional se apresentou. Este paciente apresentou mal-estar geral, febre, edema, parestesia, artralgia, orquite e adenomegalia. Após uma semana de tratamento com 300 mg/dia de talidomida, os sintomas sistêmicos reduziram de intensidade; porém, não houve uma remissão completa, as lesões de pele já se apresentavam involuídas em sua grande maioria e o quadro de orquite já havia regredido. Verificando o perfil de expressão neste caso vemos que o paciente 6 foi o que apresentou os maiores níveis de expressão gênica para TNF, IL-10 e CCR5 nas biópsias após o tratamento com talidomida. A expressão de CCL5, IFN γ , IL-2, TGF β , Foxp3 e MCP-1 também estavam aumentadas (Figura 14). Contudo, verificamos a redução na expressão dos fatores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos IL-1 β , COX-2, VEGF e IL-8. Neste caso a expressão gênica das PBMC não foi avaliada.

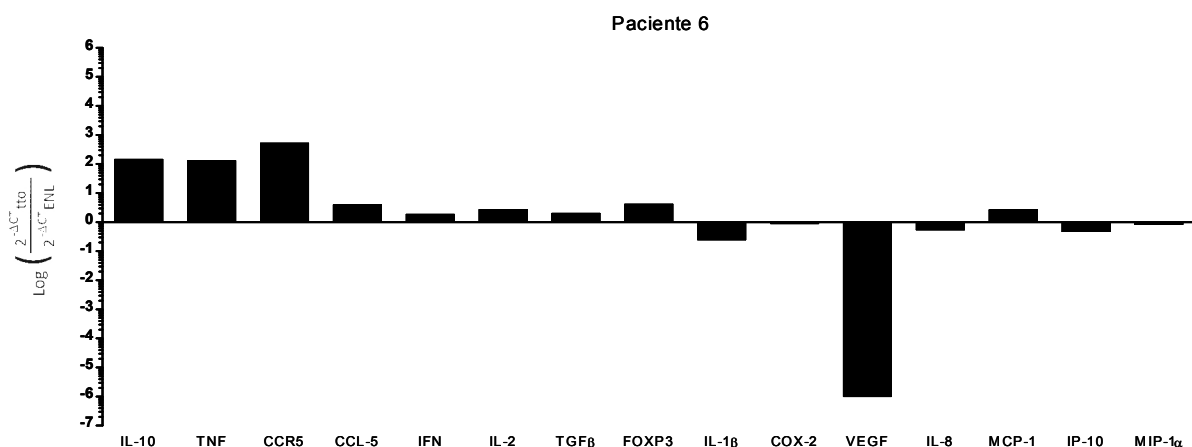


Figura 14. Perfil de expressão gênica das biópsias de pele do paciente 6 após tratamento com talidomida em comparação às biópsias obtidas no diagnóstico da reação.

O sétimo paciente apresentou pouco comprometimento sistêmico, apresentando além das lesões nodulares dolorosas somente adenomegalia. O início dos sintomas foi relatado

cerca de um mês após a alta do tratamento poliquimioterápico, sendo que o paciente ainda demorou dois meses até procurar atendimento médico. O uso da talidomida neste paciente fez com que as lesões reacionais regredissem juntamente com a adenomegalia. Neste paciente verificamos aumento na expressão gênica para IL-10, TNF, CCR5, CCL5, IFN γ , VEGF-A e IL-8 (Figura 15A). A expressão gênica para Foxp-3 não foi detectada após o tratamento, sendo indicado no gráfico somente de forma ilustrativa que o seu RNAm foi detectado em pequena quantidade na reação e foi indetectável após o tratamento, mesmo após repetições das reações de PCR. As quimiocinas MCP-1, IP-10 e MIP-1 α estavam com uma expressão gênica menor na biópsia de lesão em regressão. Nestas biópsias não testamos a expressão de IL-2, TGF β , IL-1 β e COX-2. Nas PBMC deste paciente encontramos a expressão gênica de IL-10, IFN γ e IL-2 reduzidas, e a expressão para TNF e Foxp3 estava aumentada após o tratamento (Figura 15B).

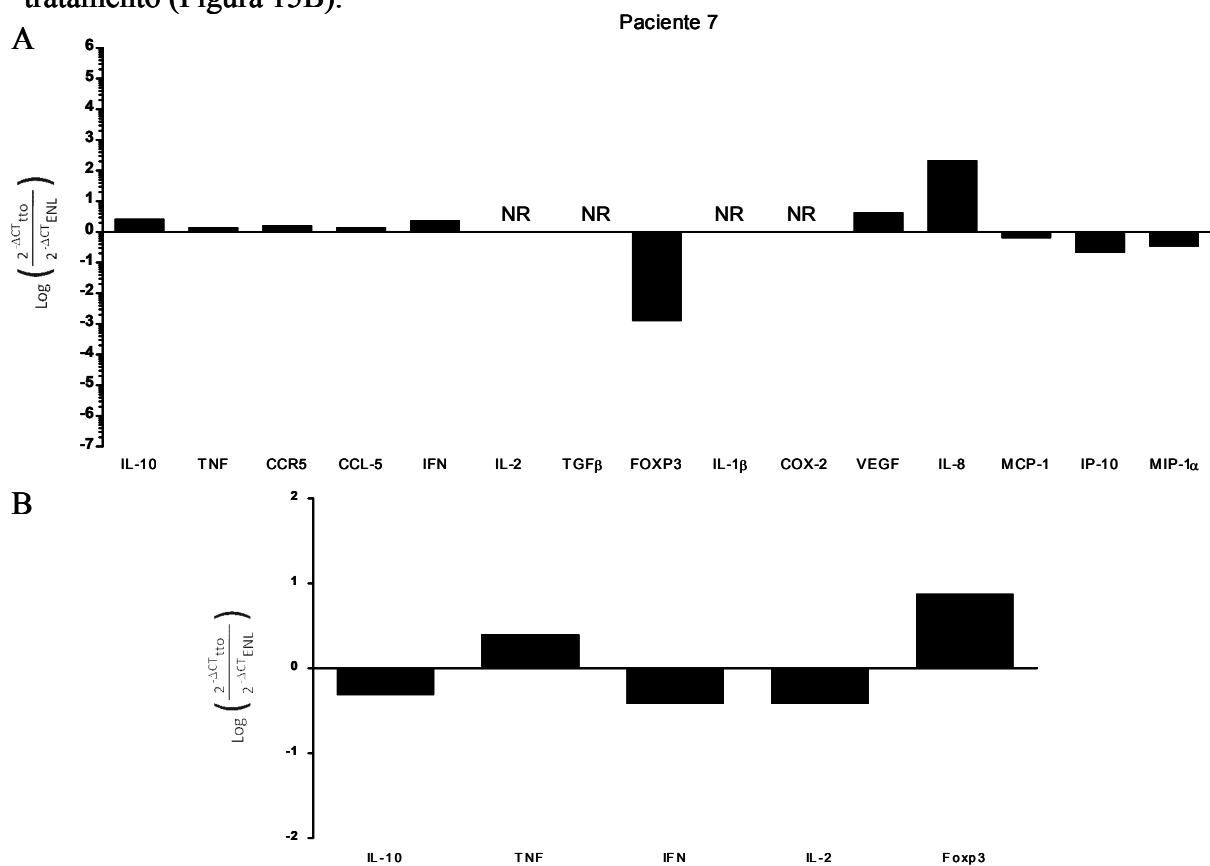


Figura 15. Perfil de expressão gênica do paciente 7 após tratamento com talidomida em comparação ao momento do diagnóstico da reação. A- expressão gênica nas biópsias. B- expressão gênica nas PBMC recém isoladas.

O paciente 8 apresentou diversos sintomas sistêmicos; porém, diferente do paciente 6 que também não apresentou melhoras sistêmicas completas após o uso da talidomida, não precisou sofrer internação hospitalar. Este paciente, após a nona dose da poliquimioterapia, relatou que começou a apresentar os sintomas da reação por 7 dias antes de procurar o serviço médico, quando foi verificado que o mesmo apresentava mal-estar geral, febre, edemas, queixas visuais e adenomegalia. Verificando a situação clínica deste paciente após o uso da talidomida, foi observado melhora da febre e ausência das queixas visuais. As lesões reacionais se apresentavam em regressão. Os outros sintomas regrediram de forma um pouco mais lenta que nos outros casos, regredindo completamente após um mês de tratamento com a talidomida. O perfil de expressão gênica observada quando comparamos a biópsia de uma lesão em regressão devido ao uso da talidomida com uma biópsia de lesão ativa antes do tratamento, indica que houve uma redução na expressão de TNF, COX-2, TGF β , VEGF e aumento na expressão de IL-2. Os demais genes não foram testados nesse paciente, bem como a expressão gênica nas PBMC.

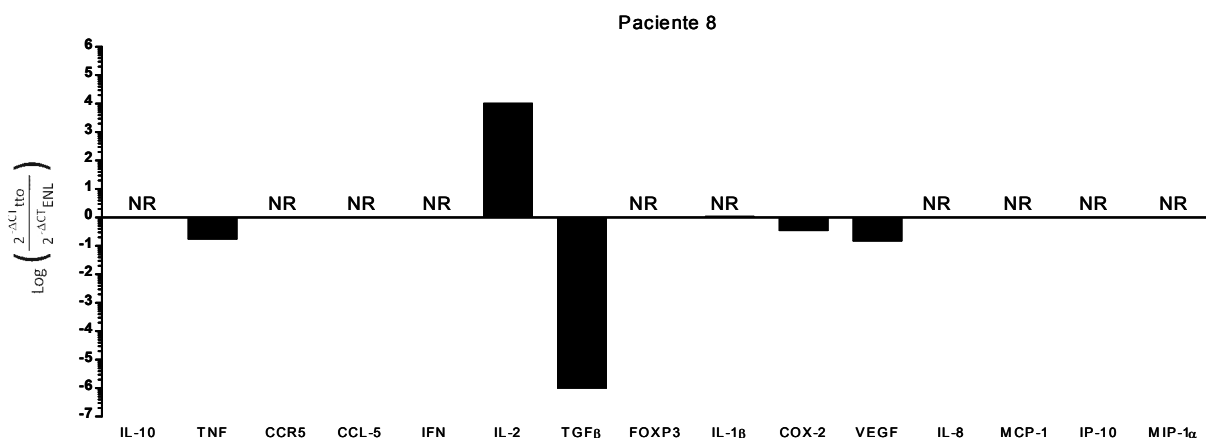


Figura 16. Perfil de expressão gênica das biópsias de pele do paciente 8 após tratamento com talidomida em comparação às biópsias obtidas no diagnóstico da reação.

4.2. TALIDOMIDA E ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T

Algumas das propriedades co-estimulatórias da talidomida sobre a ativação de células T via TCR (CD3) já foram descritas, tais como aumentar a proliferação mediada por IL-2 e

produção de $IFN\gamma$, principalmente em células $CD8^+$ não deixando de ter efeitos sobre as células $CD4^+$ (Haslett *et al.*, 1998). Já foi descrito que a talidomida aumenta a expressão de Foxp-3 nas células mononucleares de sangue periférico (PBMC) em pacientes durante o tratamento do ENL. Outro estudo descreveu o papel imuno-estimulatório da talidomida (Haslett *et al.*, 2005).

Nos casos estudados foi avaliada a expressão gênica nas PBMC de 5 pacientes, no momento da reação e após tratamento com talidomida. Verificamos a expressão de *FOXP3*, *IFN γ* , *IL2* e *IP10*. Os níveis de expressão gênica para *FOXP3* estavam aumentados em todos os casos e foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$ Wilcoxon signed rank test), confirmando os dados já publicados. Os níveis de expressão de *IFN γ* estavam aumentados em 3 dos 5 casos (com um leve aumento em um dos casos), *IL-2* nos 3 casos testados e *IP-10* em 4 de 5 casos estudados. A *IP-10* é uma quimiocina induzida por *IFN γ* e pode refletir realmente a sinalização positiva por esta via nas células que constituem a PBMC. (Figura 13).

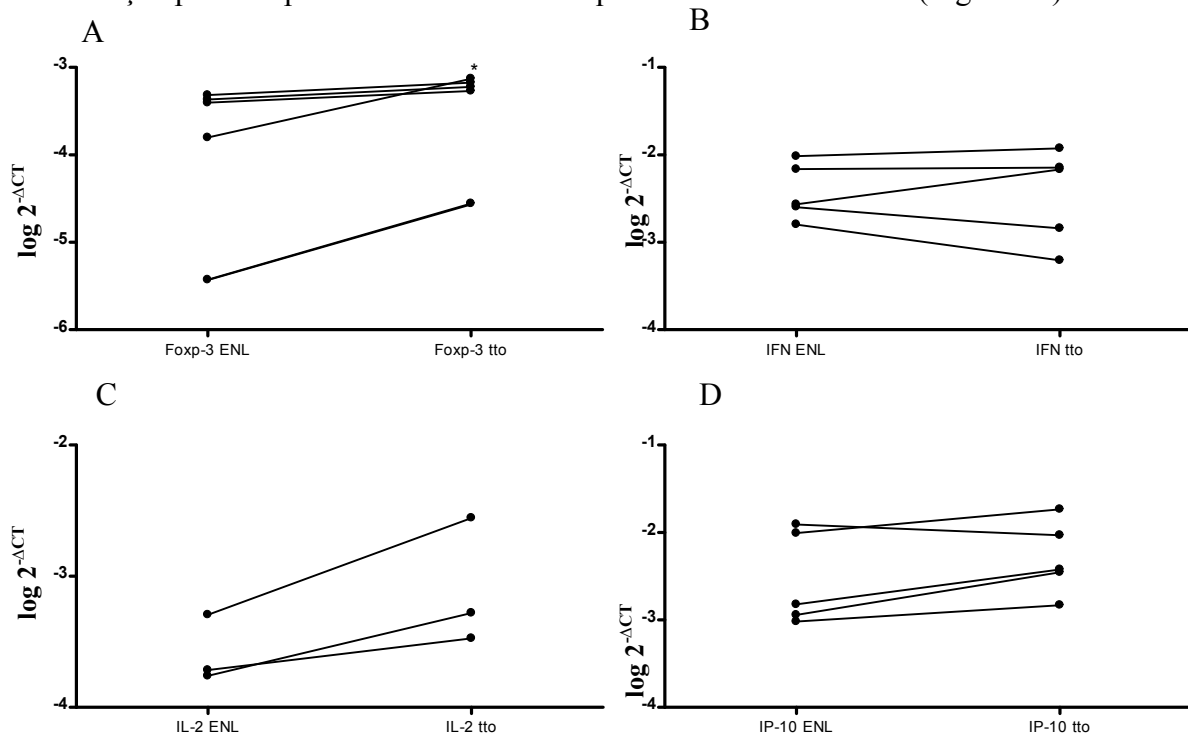


Figura-17. Níveis de expressão gênica encontrados na PBMC no momento do diagnóstico do ENL e após 7 dias de tratamento com talidomida 300mg/dia. Os resultados foram obtidos por PCR em tempo real e o gene endógeno utilizado nos testes foi o *GAPDH*, sendo os seus valores de CT subtraídos dos valores obtidos para os genes *FOXP3* (A), *IFN γ* (B), *IL2* (C) e *IP10* (D). *($P < 0,05$ Wilcoxon signed rank test).

Tendo estes indícios *in vivo*, associados aos achados de expressão gênica das biópsias de pacientes que desenvolveram ENL que foram tratados com talidomida, fomos analisar células CD4⁺ purificadas, ativadas por 24 horas com anti-CD3 imobilizado em placas de cultura na presença ou não da talidomida. A ativação via anti-CD3 levou ao aumento na expressão do gene para IL-2 após 24 horas, sendo esta indução potencializada pela adição de 30μM de talidomida à cultura em três experimentos independentes ($P < 0,05$ *One sample t test*). Testamos de forma preliminar a expressão de superfície do marcador de ativação de células T CD69 por citometria de fluxo, e confirmamos a ativação das células por haver um aumento em sua expressão após ativação com anti-CD3; porém, não detectamos alteração com o uso da talidomida. Podemos perceber que somente a incubação das células CD4⁺ com a talidomida levou a um leve aumento da produção da IL-2, porém não significativo estatisticamente. Os níveis de expressão do gene para Foxp-3 e IFN γ não sofreram alterações significativas na presença da talidomida, embora tenham aumentado em 2 dos três experimentos realizados (Figura 18).

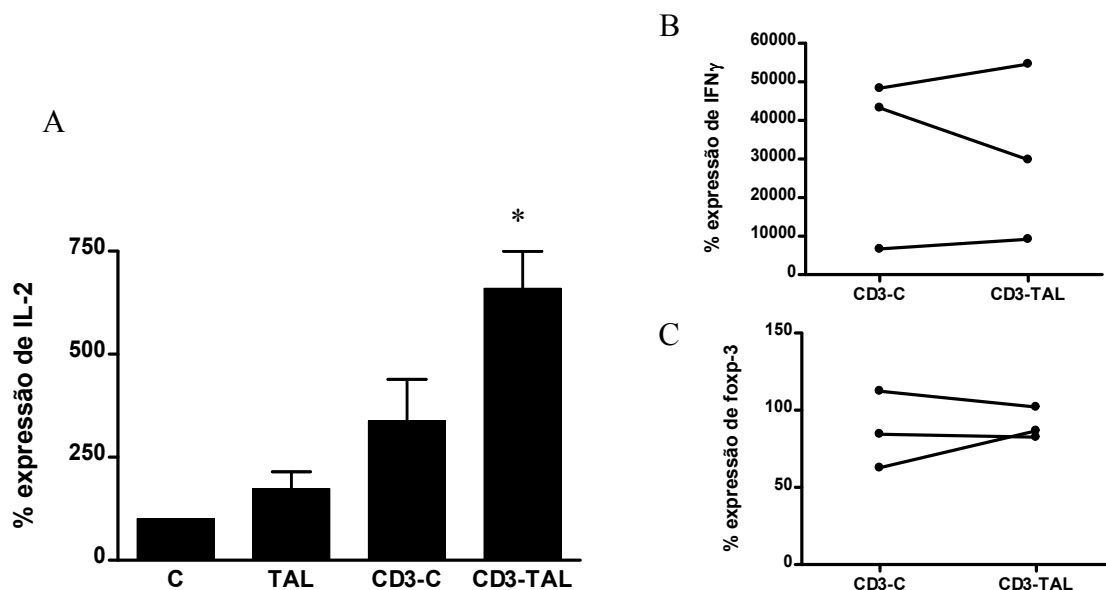


Figura-18. Níveis de expressão gênica obtidos em células CD4⁺ purificadas a partir de doadores normais, ativadas com anti-CD3 imobilizado em placas de cultura na presença ou ausência da talidomida. Os valores de expressão gênica obtidos por PCR em tempo real nas amostras controle foram utilizados para normalização dos dados sendo atribuído o valor de 100%. A- média do percentual de expressão gênica em relação à amostra controle \pm erro padrão. B e C níveis de expressão gênica individual obtida para os genes de IFN γ e Foxp-3 respectivamente. * ($P < 0,05$ *One sample t test*), $n=3$.

4.3. ANGIOGÊNESE E ENL

Diversas alterações na microvasculatura da derme de lesões de pacientes com hanseníase já foram descritas, tais como o aumento de vasos em lesões do pólo multibacilar. O ENL também é conhecido por apresentar vasculites necrosantes, afetando vasos de pequeno calibre e a ativação das células do endotélio vascular. Contudo, uma correlação direta entre o ENL e processos de angiogênese não foi estabelecida.

Um estudo realizado através da colaboração do nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Hanseníase - FIOCRUZ-RJ) e a divisão de dermatologia da Universidade da Califórnia - USA (chefiada pelo Dr. Robert Modlin) propiciou a análise em conjunto de diversos genes através da técnica de microarranjo de DNA em chips. Analisando os dados através do software “Ingenuity Pathway Analysis” que indica quais as vias de sinalização intracelular podem estar sendo ativadas, foi possível verificar que 15 vias metabólicas e de sinalização estavam moduladas positivamente no ENL em relação às biópsias de pacientes lepromatosos não reacionais. Dentre essas vias destacamos a síntese de eicosanóides, sinalização de IL-6, PI3/AKT, ativação de receptor de efrina e sinalização de VEGF, por serem todas diretamente relacionadas à angiogênese. As principais funções biológicas moduladas positivamente no ENL em comparação com as lesões sem reação estão envolvidas com a migração, proliferação de células, crescimento de tumores e a angiogênese propriamente dita (dados não publicados).

Partindo das informações de que a angiogênese induzida por um processo inflamatório pode ser um fator fundamental para o desenvolvimento das lesões no ENL e dos nossos dados

anteriores mostrando a redução da expressão de fatores pró-angiogênicos nas lesões de pacientes tratados com talidomida, nós fomos observar como se apresentava a microvasculatura nessas lesões. Através de imunohistoquímica específica para o fator VIII da cascata de coagulação, produzido pelo endotélio vascular, constatamos em 3 casos de ENL o aumento de sua marcação e conseqüente aumento da microvasculatura cutânea e redução durante tratamento com talidomida, sendo mostrado logo abaixo um caso representativo (Figura 20). Em paralelo, fizemos marcações para VEGF-A através da mesma técnica em cortes seqüenciais, demonstrando uma marcação difusa pela derme e na microvasculatura por este fator nas biópsias de pele em reação (Figura 19). Este resultado é condizente com os dados de expressão gênica onde a expressão de VEGF-A nas biópsias de 4 pacientes antes e durante a reação foram comparadas, mostrando um aumento na reação (Figura 19).

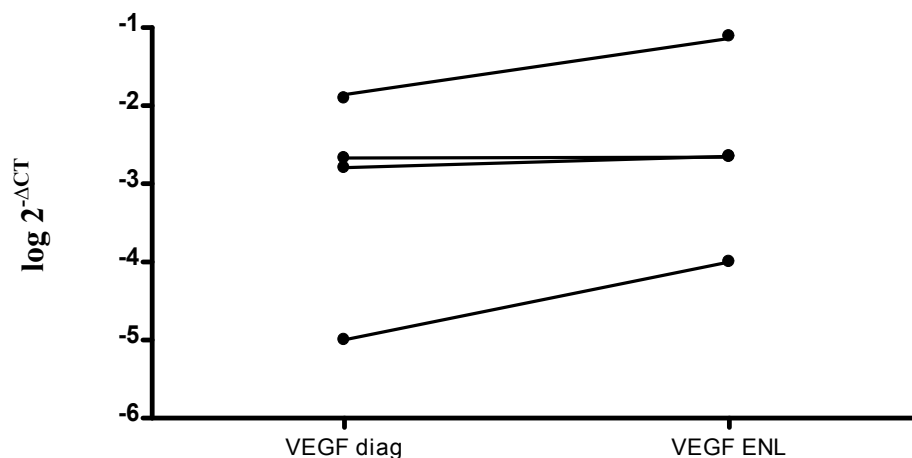
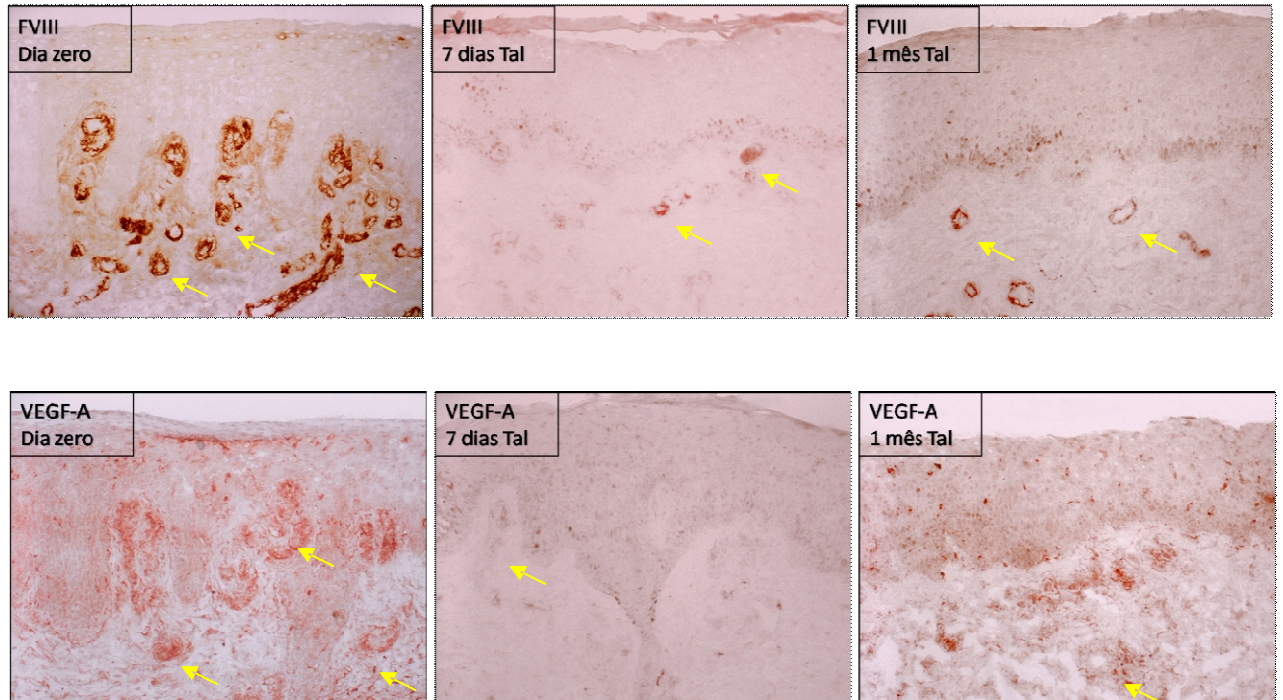


Figura 19. Nível de expressão do gene para VEGF-A em 4 pacientes multibacilares que desenvolveram o quadro de ENL. Estes resultados foram obtidos por PCR em tempo real com primers e sonda desenhada para o sistema taqman.

Estudamos o caso a parte dos descritos anteriormente, um paciente com 38 anos de idade, que apresentou um quadro severo de reação tipo II e que foi tratado com talidomida. Deste paciente, obtivemos biópsias de pele antes do tratamento, após 7 e 30 dias de tratamento. Na biópsia coletada no diagnóstico da reação, verificamos um extenso infiltrado inflamatório e espessamento da epiderme. A presença densa de pequenos vasos é visualizada com a marcação para FVIII. A marcação para VEGF era difusa pela derme nos cortes analisados, podendo ser vista a marcação também nos vasos. Por imunohistoquímica verificamos que a expressão para VEGF e FVIII foi reduzida após o tratamento. Após o tratamento com talidomida, verificamos uma redução no infiltrado já com 7 dias de tratamento o que era mais pronunciado após 30 dias. As alterações no espessamento da epiderme continuavam, contudo a redução da densidade vascular evidenciada pela marcação do FVIII era visualmente menor, bem como a marcação para VEGF-A (Figura 20A). Em paralelo, analisamos por RT-PCR em tempo real a expressão para VEGF-A e IL-8 antes e após 7 dias de tratamento com talidomida, o que mostrou uma redução nos níveis destes três fatores que possuem atividade pró-angiogênica (Figura 20B).

A



B

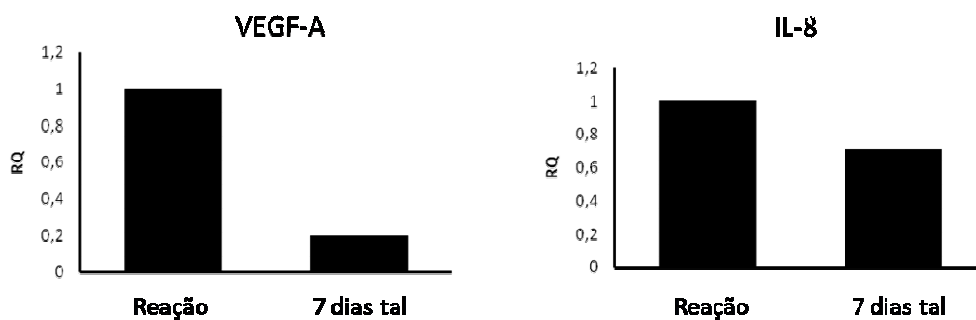


Figura-20. Alterações na microvasculatura na derme de um paciente que desenvolveu um grave episódio de reação do tipo II e foi submetido ao tratamento com talidomida 300 mg/dia. A- As seções das biópsias de pele foram marcadas por imunohistoquímica para FVIII que evidencia os vasos presentes na derme (setas), e também foram marcadas para VEGF-A (marcado difusamente pelo infiltrado e nos vasos marcados por setas). B- resultados de expressão gênica nas biópsias, mostrando a redução na expressão para os genes de VEGF-A e IL-8.

Como já é conhecido, o TNF é uma citocina chave para o desencadeamento do ENL e pode agir ativando o endotélio vascular e sinalizar positivamente a angiogênese. Testamos *in vitro* a ação da talidomida sobre células endoteliais de veias de cordão umbilical (HUVECs) ativadas com TNF recombinante. A expressão de TNF, VEGF-A, COX-2 e IL-8, todos com ação pró-angiogênica, foram avaliadas após 3 horas de estímulo com TNF recombinante na presença da talidomida. Para análise dos dados de expressão gênica, por se tratar de células primárias e podermos agrupar os resultados, os valores foram normalizados assumindo que o estímulo com TNF na presença do solvente DMSO teria um valor de 100%.

A expressão dos quatro marcadores estudados foi modulada positivamente após estímulo com TNF, sendo TNF e IL-8 induzidos em maior escala em relação ao controle e COX-2 e VEGF-A sofrendo um aumento médio em cerca de 70%. Com o tratamento prévio das células com talidomida à 30 μ M, observamos a redução na expressão para os quatro genes ($P < 0,01$ *One sample t test*), sendo os níveis de mensagem para TNF reduzido para 53.00% \pm 3.5 (SEM), n=4; IL-8 reduzido para 20.16% \pm 13.4 (SEM), n=4; COX-2 reduzido para 44,98% \pm 12.2 (SEM), n=5 e, VEGF-A reduzido para 59.94% \pm 5.3 (SEM), n=5. (Figura 21).

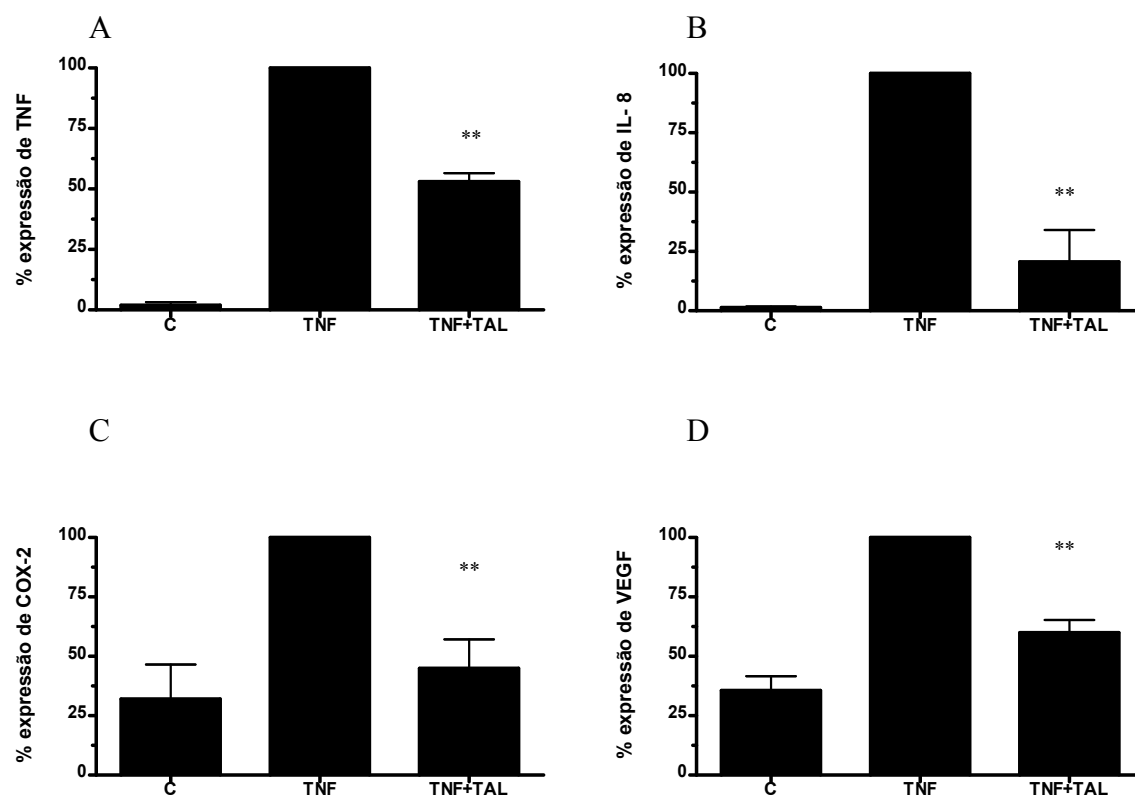


Figura-21. A talidomida altera o padrão de expressão gênica em HUVEC ativadas por 10 ng/ml de TNF recombinante. Os resultados obtidos por PCR em tempo real foram normalizados para percentual de expressão em relação às células ativadas com TNF que receberam o valor de 100%. O pré-tratamento com 30 μ M de talidomida impediu o aumento da expressão para os genes de TNF (A), IL-8 (B), COX-2 (C) e VEGF-A (E). ** $P < 0,01$ One sample *t* test, $n=3$.

4.4. ANÁLOGOS DA TALIDOMIDA

A talidomida, que estruturalmente é composta por um grupamento fitalimida e um grupamento glutarimida possui também um carbono assimétrico no grupamento glutarimida que lhe atribui a capacidade de se apresentar de forma racêmica (Figura 6). A partir dos primeiros estudos de correlação entre atividade e estrutura da talidomida, verificou-se que a forma racêmica “S” detém as propriedades teratogênicas, e que o grupamento fitalimida era essencial para as atividades antiinflamatórias. Diversos análogos foram então sintetizados

buscando redução dos efeitos colaterais e potencialização de algumas funções biológicas, tais como antiinflamatória e antitumoral.

O laboratório de avaliação e síntese de substâncias bioativas (LASSBio) da UFRJ sintetizou uma série de análogos da talidomida que foram testados *in vivo* sobre a capacidade de inibir a produção de TNF e migração de neutrófilos nos pulmões de camundongos induzidos pela aspiração de LPS (Lima *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2005). Destacamos destes estudos dois análogos que possuíam maior atividade inibitória sobre a produção de TNF (LASSBio-468 e 542) e testamos *in vitro* sobre a produção de TNF e IL-10 induzida por LPS em PBMC humana em comparação à talidomida.

A concentração final no meio de cultura de LPS utilizada para a indução de citocinas foi de 10ng/ml. Os níveis de TNF e IL-10 nos sobrenadantes foram determinados por ELISA, sendo que três concentrações da talidomida e dos análogos (15, 30 e 100 μ M) foram testadas. Por estarmos trabalhando com células de doadores normais, a faixa de produção das citocinas foi bastante diversa nos obrigando a normalizar os resultados, de forma que o resultado do estímulo com o LPS adicionado do solvente (DMSO a 0,1%) foi usado como valor de referência, sendo atribuído o valor de 100%. A análise estatística foi feita através do teste *One sample t test*, assumindo como 100% o valor hipotético. Na faixa de concentração testada, verificamos através da técnica de MTS que tanto a talidomida quanto os análogos não possuíam toxicidade sobre a PBMC (Figura 22).

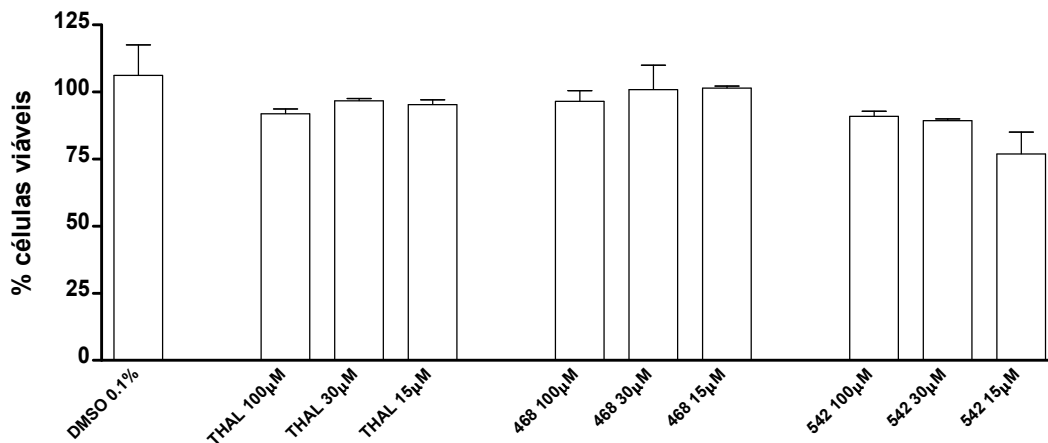


Figura-22. A talidomida e os análogos estudados não interferem na viabilidade das células utilizadas. A PBMC foi incubada por 48 horas na presença das drogas ou solvente, sendo o meio de cultura trocado por um meio adicionado de 10% da solução de MTS nas últimas 3 horas e lido por espectrofotômetro a 490 nm. As células incubadas em meio puro foram tomadas como 100% de células viáveis para os cálculos (n=5).

Verificando então como a talidomida era capaz de modular a produção de TNF, observamos que a produção de TNF foi reduzida em média para $55.15\% \pm 9.1$ (SEM) n=3, $p < 0.05$, $61.36\% \pm 5.3$ (SEM), n=14, $p < 0.0001$ e $64.84\% \pm 9.8$ (SEM), n=4 e $p < 0.05$ nas concentrações de 100, 30 e $15\mu\text{M}$ respectivamente. A produção de IL-10 também foi modulada pela talidomida, porém levando ao aumento da sua produção em média para $133.25\% \pm 5.6$ (SEM), n=3, $p < 0.05$, $138.49\% \pm 5.2$ (SEM), n=5, $p < 0.005$ e $117.38\% \pm 9.6$ (SEM), n=4 nas concentrações de 100, 30 e $15\mu\text{M}$ respectivamente (Figura 23).

O análogo LASSBio-468 não demonstrou capacidade de modular a produção de TNF e IL-10 induzidos por LPS em PBMC humana, *in vitro*, sendo a produção de TNF induzida por LPS na presença do análogo LASSBio-468, $108.7\% \pm 20$ (SEM), n=4, $103.3\% \pm 13.6$ (SEM), n=9 e $95.5\% \pm 9.5$ (SEM), n=3 nas concentrações de 100, 30 e $15\mu\text{M}$ respectivamente, como mostrado na Figura 24A. A produção de IL-10 induzida por LPS na presença do análogo LASSBio-468 foi de $122.4\% \pm 7.9$ (SEM), n=4, $117.8\% \pm 6.3$ (SEM), n=5 e $109.3\% \pm 2.6$

(SEM), n=3 nas concentrações de 100, 30 e 15 μ M respectivamente, como mostrado na Figura 24B.

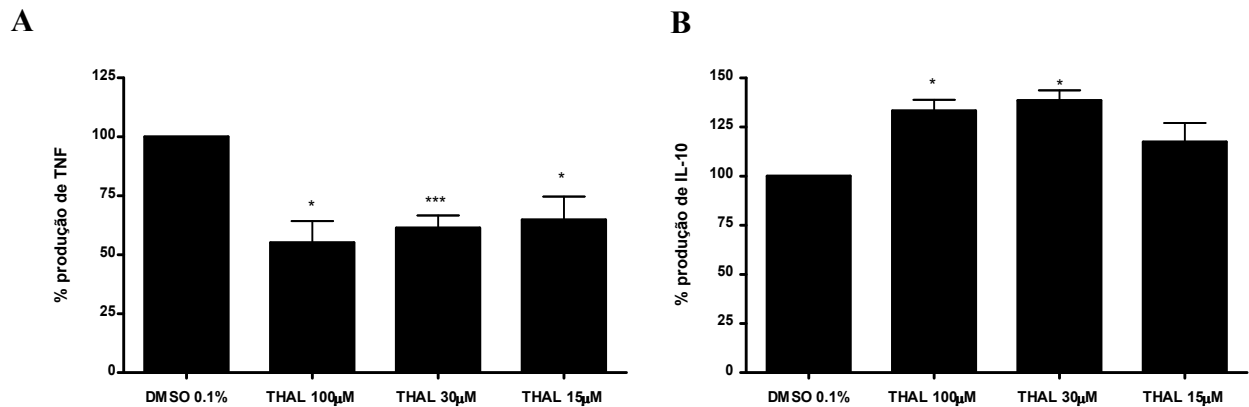


Figura-23. Níveis de secreção de TNF (A) e IL-10 (B) para o sobrenadante de culturas de PBMC estimuladas com LPS (10 ng/ml) após pré-tratamento com a talidomida nas concentrações indicadas. Os valores foram obtidos por ELISA e normalizados para porcentagem, sendo as amostras tratadas com LPS na presença somente do solvente DMSO atribuídos o valor de 100%. *One sample t test*. * P<0.05, *** P<0.0001.

Quando fomos estudar o análogo LASSBio-542 verificamos que este demonstrou capacidade em reduzir a produção das citocinas TNF e IL-10. A produção de TNF induzida por LPS na presença do análogo LASSBio-542 foi reduzida para 54.6% \pm 10.9 (SEM), n=4, p<0.05, 71.8% \pm 4.5 (SEM), n=9, p<0.005 e 78.1% \pm 11.4 (SEM), n=4 nas concentrações de 100, 30 e 15 μ M respectivamente, conforme ilustrado na Figura 24C. Já a produção de IL-10 induzida por LPS na presença do análogo LASSBio-542 foi alterada para 19.9% \pm 16.7 (SEM), n=4, p<0.05, 60.9% \pm 3.4 (SEM), n=9, p<0.005 e 87.0% \pm 4.3 (SEM), n=4 nas concentrações de 100, 30 e 15 μ M respectivamente, conforme ilustrado na Figura-24D.

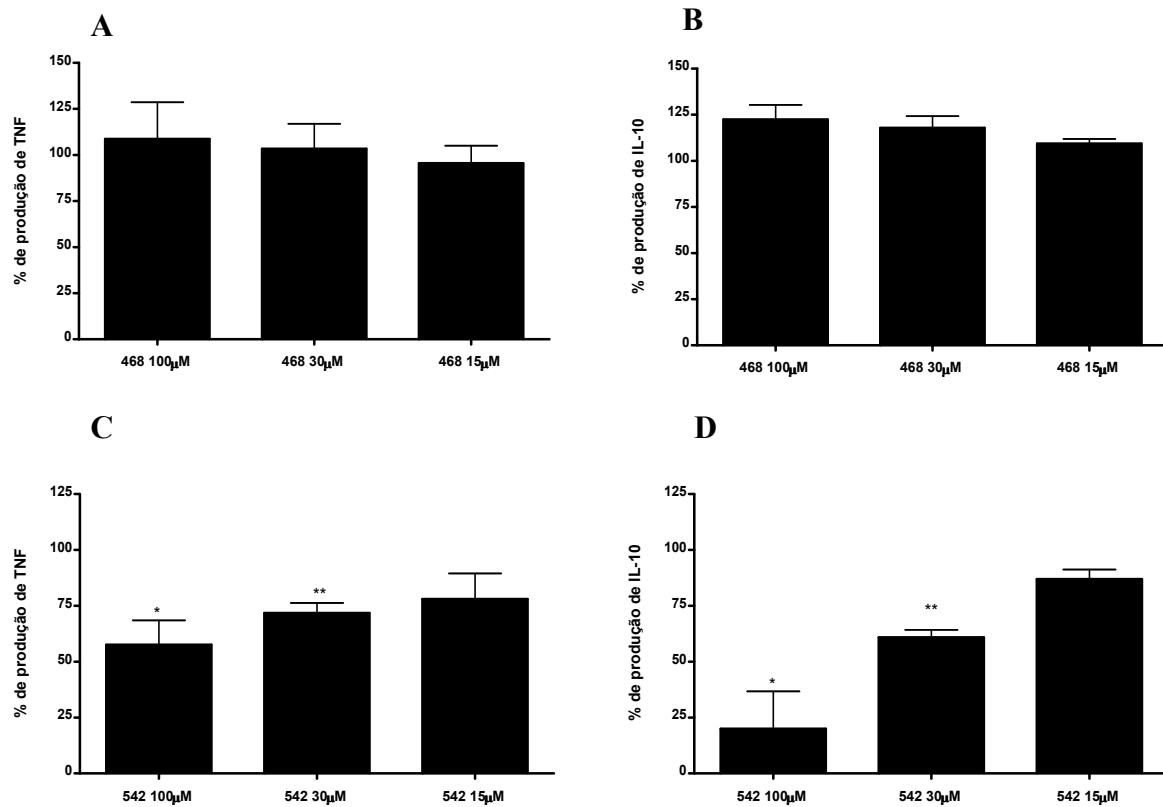


Figura-24. Níveis de produção das citocinas TNF e IL-10 nos sobrenadantes de culturas de PBMC tratadas com os análogos da talidomida e estimuladas com LPS por 20 horas. A produção de citocinas foi avaliada por ELISA e os valores obtidos pelo estímulo com LPS nas células pré-tratadas somente com DMSO 0.1% foi utilizado como referência para normalização dos dados, sendo atribuído o valor de 100%. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ *One sample t test*.

Foi avaliado se o análogo LASSBio-542 possuía a capacidade de modular a ativação de NF- κ B via TNF em PBMC humana. A ativação da PBMC com TNF recombinante humano a 10ng/ml na presença do solvente DMSO 0,1% por 30 minutos levou a translocação dos dímeros de NF κ B para o núcleo das células, o que pode ser visualizado nas autoradiografias obtidas no ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA) realizado com as amostras de proteínas nucleares incubadas com sequências consenso do NF κ B. A pré-incubação das células com a talidomida ou análogo LASSBio-542 por 30 minutos, seguida da adição do TNF e incubação por mais 30 minutos até a lise das células para preparo do extrato nuclear levou a uma redução na intensidade das bandas formadas pelos dímeros associados à

sonda radioativa em quatro experimentos independentes. A quantificação da intensidade das bandas demonstra com mais clareza a redução da migração dos dímeros de NF- κ B para o núcleo, quando na presença da talidomida reduzindo para 74,2% (\pm 1,5 erro padrão, n=4, $P < 0.05$ *Dunnett's multiple comparison test*) e na presença do análogo LASSBio-542 para 67,79% (\pm 2,3 erro padrão, n=4, $P < 0.05$) (Figura 25).

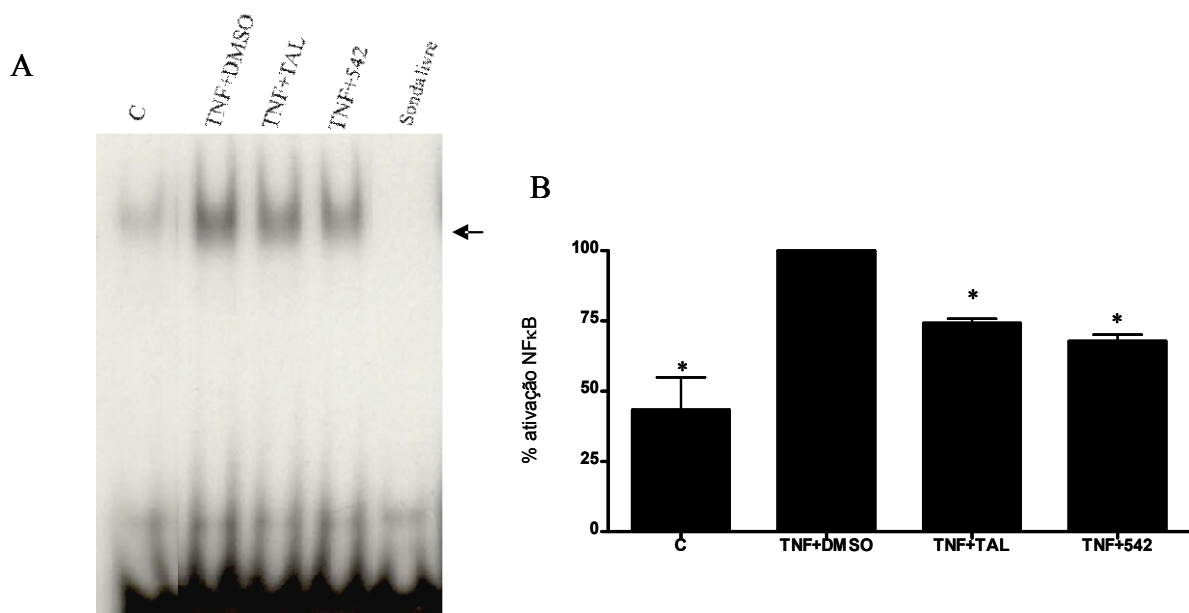


Figura 25. Ativação de NF- κ B em PBMC humanas por TNF é modulada negativamente pela talidomida e pelo análogo LASSBio-542. A- autoradiografia de um gel de poliacrilamida, no qual extratos nucleares de PBMC pré-tratados ou não com talidomida e ativadas com 10ng/ml de TNF recombinante foram submetidos a eletrofores vertical. As bandas superiores indicadas pela seta são relativas à redução da migração eletroforética das sondas radiotivas específicas para NF- κ B devido à associação com os dímeros presentes no extrato nuclear. A sonda sem adição do extrato nuclear apresenta-se na parte inferior da autoradiografia. B- gráfico mostrando a quantificação relativa das bandas de 4 experimentos independentes, TNF+DMSO foi atribuído valores de 100% e a análise estatística dos dados (*Dunnett's multiple comparison test*) demonstra a diferença estatística das outras amostras em relação a esta.

Confirmado o potencial do análogo LASSBio-542 em reduzir a produção de TNF induzida por LPS, testamos a sua ação sobre células endoteliais de vasos sanguíneos de cordão umbilical (HUVECs). Da mesma forma como foi realizado com a talidomida,

testamos se o análogo LASSBio-542 era capaz de modular a expressão gênica em HUVEC estimulada com TNF recombinante por 3hs. Este teste foi capaz de demonstrar que o análogo LASSBio-542 em uma concentração de 30 μ M agiu reduzindo significativamente ($P < 0,01$ *One sample t test*) a expressão de alguns genes envolvidos com a ativação das células endoteliais pelo TNF e que são classificados como pró-angiogênicos. O próprio gene de TNF foi reduzido para $66.33\% \pm 2.3$ (SEM), $n=4$; a expressão do gene da IL-8 foi reduzida em $58.58\% \pm 1.4$ (SEM), $n=4$; a expressão do gene da COX-2 foi reduzida para $67.50\% \pm 7.4$ (SEM), $n=4$; e redução na expressão do gene para VEGF para $66.04\% \pm 4.9$ (SEM), $n=5$. (Figura 26).

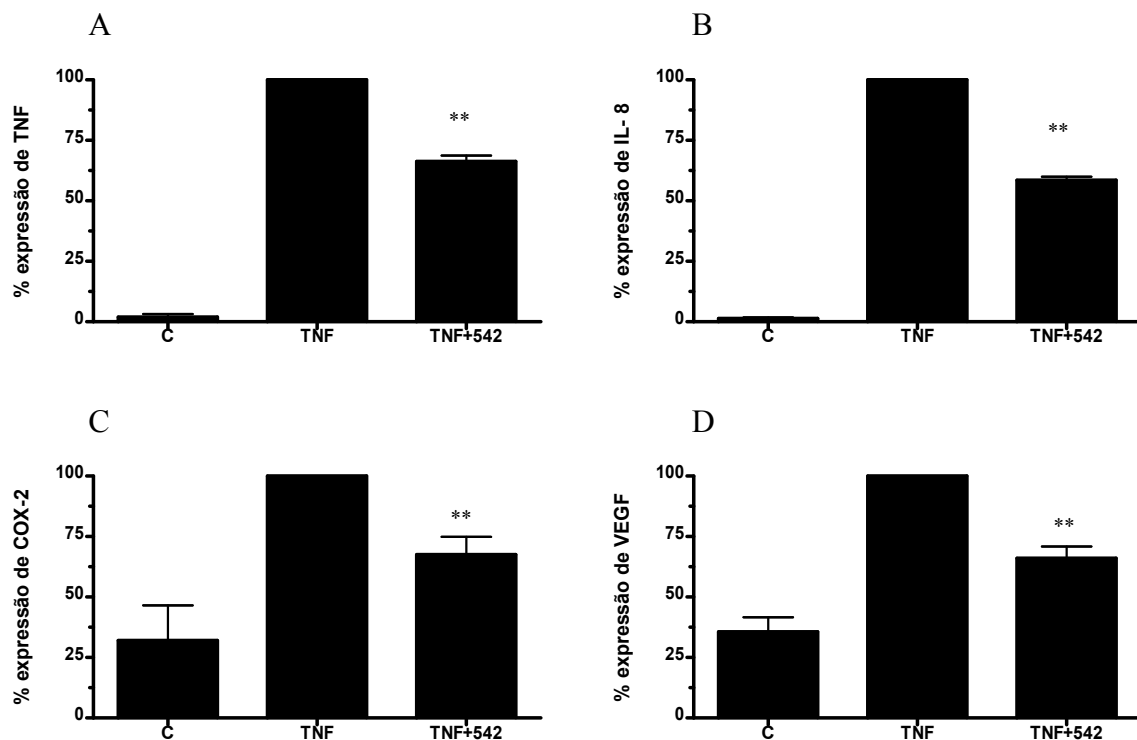


Figura-26. O análogo LASSBio-542 altera o padrão de expressão gênica em HUVECs ativadas por 10 ng/ml de TNF recombinante. Os resultados obtidos por PCR em tempo real foram normalizados para percentual de expressão em relação às células ativadas com TNF que receberam o valor de 100%. O pré-tratamento com 30 μ M do análogo impediu o aumento da expressão para os genes de TNF (A), IL-8 (B), COX-2 (C) e VEGF-A (E). ** $P < 0,01$ *One sample t test*, $n=3$.

Testamos também a capacidade do análogo LASSBio-542 em reduzir a formação de estruturas tubulares por HUVECs quando cultivadas sobre matrigel. Estas estruturas são correlacionadas com formação de vasos sanguíneos, sendo um modelo bastante utilizado na pesquisa de drogas que possam vir a interferir na angiogênese. Cerca de 4×10^3 HUVECs de doadores normais foram semeadas em poços de placas de 96 cavidades, recobertos com uma camada de $30 \mu\text{L}$ de matrigel empobrecido de fatores de crescimento. Nestas condições, as estruturas são formadas após 18 horas de cultura e podem ser visualizadas em microscópio invertido no aumento de 10×10 vezes. A adição do solvente DMSO a $0,01\%$ não alterou a formação das estruturas tubulares, porém podemos ver nas fotos de um experimento representativo a redução na formação das estruturas tubulares na presença da talidomida e do análogo LASSBio-542, ambos na concentração de $30 \mu\text{M}$ (Figura 27). Dentre os processos que levam a angiogênese, a proliferação celular é um dos seus fatores fundamentais. A proliferação das HUVECs *in vitro* também foi avaliada pela técnica de MTS, onde não observamos alterações significativas no número de células viáveis após 72 horas de cultura na presença da talidomida e do análogo LASSBio-542 nas concentrações de 10 e $30 \mu\text{M}$, o que demonstra que a talidomida e o análogo não reduziram a angiogênese por alterações na proliferação e que também não causaram efeitos tóxicos às células (Figura 23).

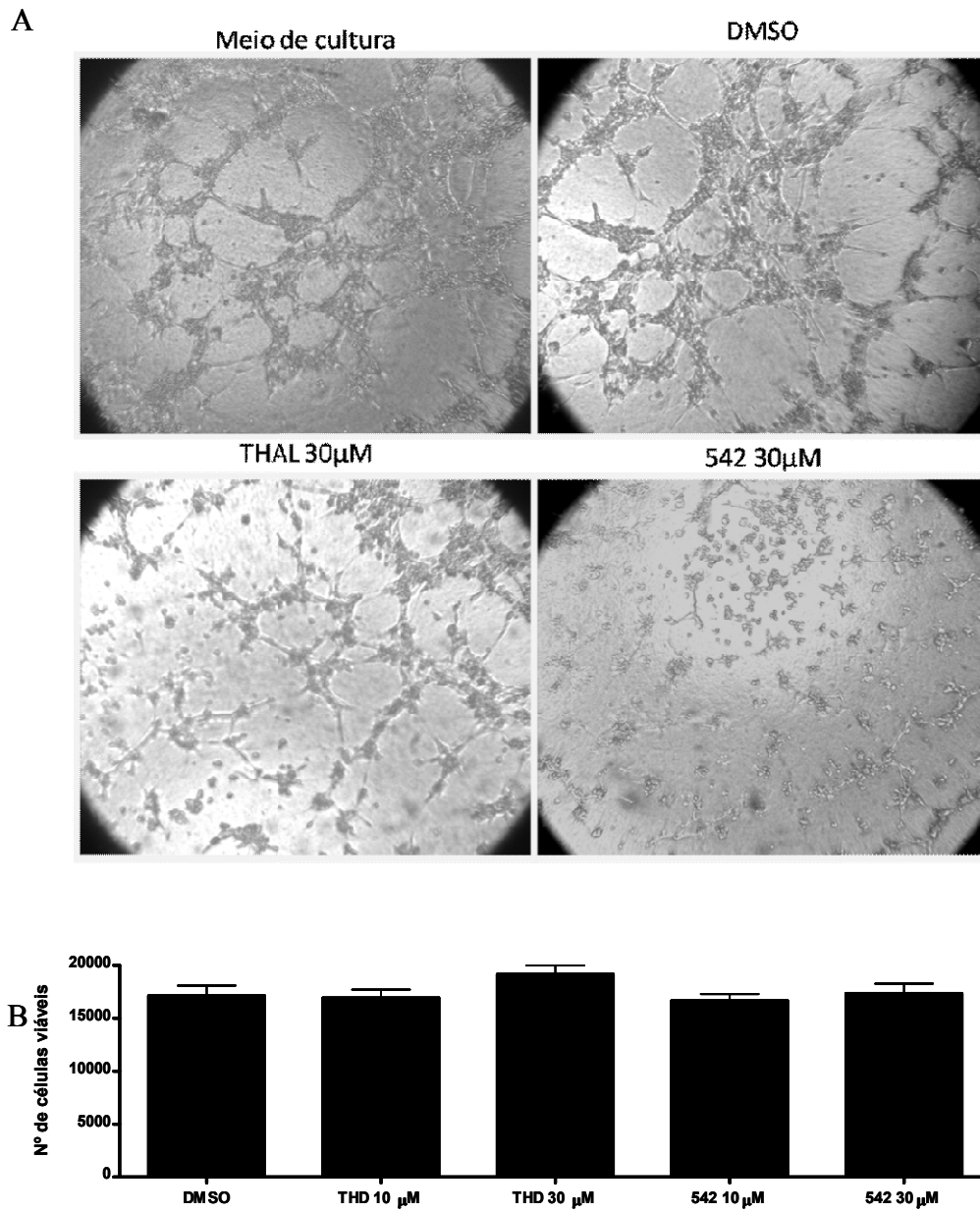


Figura 27. A Talidomida e o análogo LASSBio-542, levam à redução da formação de estruturas tubulares compatíveis com o processo de angiogênese sem alterar a sua proliferação. A- HUVEC sobre matrigel após 8 horas de cultura, fotografia obtida através de microscópio invertido com aumento de 10x10 vezes. B- quantidade de células viáveis após 48 horas de cultura na presença das drogas, resultado obtido pela técnica de MTS com curva padrão de células somente em meio de cultura.

5. DISCUSSÃO

Os episódios reacionais da hanseníase levam às principais complicações da doença, incluindo a piora do comprometimento neurológico e conseqüente aumento do grau de incapacidade (Britton *et al.*, 2004). Em especial, as reações do tipo II (ENL) são as mais preocupantes, pois são as principais causas de internação e morbidade da hanseníase. Apesar do avanço alcançado para controle da doença pela poliquimioterapia padronizada para as formas polares da doença, o controle eficaz dos episódios reacionais e a identificação precoce dos pacientes que irão desenvolvê-los ainda não são completamente satisfatórios. Desse modo, no presente trabalho nos propusemos a avaliar o mecanismo de ação da talidomida sob o controle do ENL, o que favorece o entendimento do desenvolvimento da doença.

Foram acompanhados pacientes que desenvolveram ENL e receberam como tratamento antiinflamatório somente a talidomida. Apesar da complexidade dos casos, verificada pela variedade dos tipos de sintomas sistêmicos apresentados, resumidos na Tabela 3, a principal conclusão é que o uso da talidomida é capaz de controlar o ENL, principalmente as lesões reacionais caracterizadas por nódulos doloridos localizados na pele em diversas partes do corpo. A remissão de sintomas mais graves como a orquite e a parestesia são exemplos importantes que justificam o uso da talidomida nestes casos. A primeira descrição do uso da talidomida para tratar pacientes com ENL, em 1965, já indicava que a melhora dos pacientes acontecia já no primeiro dia de tratamento, reduzindo principalmente o mal-estar geral e a melhora das lesões reacionais (Sheskin, 1965).

Nos pacientes avaliados neste trabalho, a heterogeneidade do período em que eles desenvolveram o seu primeiro episódio de reação do tipo II, dificulta uma conclusão definitiva se o ENL é realmente desencadeado devido ao tratamento e conseqüente aumento

de componentes oriundos da degradação dos bacilos que desencadeariam uma resposta humoral e depósito de imunocomplexos nos vasos, hipótese descrita anteriormente (Kahawita *et al.*, 2008). Possivelmente esta tese para o desencadeamento do ENL seja pertinente, porém não é suficiente para explicar o tipo de resposta inflamatória com características crônicas apresentada pelos pacientes. A resposta inflamatória observada no desencadeamento do ENL é complexa, e o aumento considerável dos níveis séricos de TNF, IL-1 β e IL-6 correlaciona-se com a imunopatologia da reação e suas complicações (Moreira *et al.*, 1993; Sampaio *et al.*, 1998b; Sarno *et al.*, 1991).

Nos casos apresentados, dois dos pacientes apresentaram os sintomas de ENL antes do início da poliquimioterapia, quatro desenvolveram a reação após início do tratamento, sendo que somente um no primeiro bimestre e os outros com cinco, oito e nove meses após o tratamento. Nestes casos, torna-se complicado sugerir o motivo para o início da reação. Dois dos casos desenvolveram a reação logo após o término do tratamento, com dois e três meses pós-alta, respectivamente. Pode ser discutido se a descontinuação da clofazimina seria responsável pelo aparecimento da reação, uma vez que sua utilização no tratamento de multibacilares pode ser justificada por reduzir o aparecimento das reações além da sua propriedade bacteriostática original. No entanto, para a clofazimina ter atividade antiinflamatória efetiva deve ser utilizada em doses elevadas, cerca de 300 mg/dia quando o seu uso na poliquimioterapia é de 100 mg/dia (Van Veen *et al.*, 2009).

O tempo em que cada paciente começou a apresentar os sintomas relativos à reação e procurou o serviço de saúde foi bastante variado. Como a evolução dos sintomas sistêmicos de cada paciente foi diferenciada, ocorrendo logo após o surgimento dos nódulos ou ainda demorar diversos dias para se apresentar, trabalhamos com algumas diferenças de estágio de desenvolvimento das lesões reacionais o que pode ter resultado na diferença dos padrões de

expressão gênica observados. Contudo, os resultados aqui apresentados indicam algumas funções biológicas alteradas na reação e que foram moduladas pela talidomida conforme discutido posteriormente.

Nas nossas análises, verificamos que o aumento na expressão dos genes para IL-10, TNF e CCR5 ocorreu de forma estatisticamente significativa após o tratamento com a talidomida, indicando que estes fatores são os que se comportaram de forma homogênea dentre os casos que nós estudamos.

A diversidade apresentada nos perfis de expressão e no comportamento clínico de cada caso não nos permite descartar as alterações observadas por cada paciente na expressão dos genes que não se comportaram de forma homogênea. O paciente 6 foi o que apresentou maior expressão de TNF após o tratamento com a talidomida, já possuindo uma expressão bastante elevada durante a reação, o que pode justificar o fato deste ser o quadro de ENL mais severo dentre os aqui estudados. No entanto, a exclusão desse caso na análise pelo teste *Wilcoxon signed rank* manteve a significância estatística ($p \leq 0,1$), o que indica que a expressão de TNF estava realmente aumentada nas biópsias estudadas.

Dados anteriores de nosso grupo demonstraram redução na expressão de TNF em biópsias de pacientes tratados com talidomida (Moraes *et al.*, 2000). Alguns fatores parecem contribuir para as diferenças observadas entre os nossos achados atuais e os anteriores. Em primeiro lugar, no estudo realizado por Moraes e cols. (2000), o período de tratamento com talidomida dos pacientes com ENL incluídos no estudo foi de 3 e 7 dias, respectivamente. Em segundo lugar, no presente estudo foram apresentados resultados de RT-PCR em tempo real semi-quantitativo de amostras de RNA total obtido de biópsias de pele integrais, enquanto no outro os resultados são obtidos por RT-PCR semi-quantitativo convencional de RNA total

obtido da derme. Teles e cols. (2002) demonstraram que o tratamento antiinflamatório com pentoxifilina e com talidomida aumenta a expressão gênica de TNF na epiderme, mas não na derme de pacientes com ENL. Tal achado pode explicar o aumento de TNF observado em nosso estudo, uma vez que foram utilizadas biópsias integrais de pele.

A involução completa da lesão parece ser fundamental para que a redução da expressão dos marcadores inflamatórios seja observada. Para haver a atividade de reparo em tecidos lesionados a presença de citocinas pró-inflamatórias é fundamental para a renovação tecidual o que pode realmente contribuir para a dificuldade de se obter um perfil homogêneo em todos os casos já que as biópsias pós-tratamento podem estar em estágios diferenciados de regressão (Gillitzer *et al.*, 2001). O paciente 7 foi acompanhado até o 30^o dia de tratamento, situação na qual os níveis de citocinas pró-inflamatórias, inclusive o TNF, já haviam reduzido (não mostrado).

Outro aspecto de destaque é que, no presente estudo, demonstramos que a talidomida é capaz de reduzir os efeitos da ativação do TNF sobre as células endoteliais *in vitro*. Já foi demonstrado que a talidomida é capaz de reduzir a ativação de NF- κ B quando há sinalização via receptor de IL-1 β (IL-1R) ou em vias semelhantes como no caso via receptor 1 de TNF (TNF-R1), porém a ativação de NF- κ B com ceramidas não seria modulada pela talidomida mostrando haver dependência da via de ativação para ocorrer a modulação da translocação deste fator de transcrição para o núcleo (Majumdar *et al.*, 2002). O TNF exerce diversos efeitos pró-inflamatórios, como no caso da ativação do endotélio vascular, onde favorece a transmigração de células da corrente sanguínea para os tecidos inflamados. O efeito benéfico da talidomida em todos os casos aqui estudados, tal qual o sucesso na regressão das lesões do ENL já descrito na literatura e conhecido na prática clínica, pode ser diretamente correlacionado com a redução dos efeitos do TNF sobre as células da derme, epiderme,

epitélio vascular e infiltrado leucocitário, associado à redução na expressão de outros fatores inflamatórios que são produzidos em conjunto devido ao desequilíbrio na resposta imune localizada na lesão. Estes fatores inflamatórios podem agir de forma parácrina, sustentando o perfil pró-inflamatório observado nas lesões de ENL.

O papel antiinflamatório da IL-10 também se mostra como uma das alterações importantes para a ação da talidomida, embora esse não seja um dos principais efeitos buscados quando se aplica a talidomida como opção de tratamento. O papel anti-angiogênico e anti-citocinas pró-inflamatórias é sempre indicado pela maioria dos trabalhos científicos como o principal motivo pelo uso da talidomida, não sendo uma droga procurada por aumentar a produção de IL-10 (Sampaio *et al.*, 2006). Demonstramos que em todos os casos estudados a IL-10 teve sua expressão gênica aumentada nas lesões em regressão após o uso da talidomida, e também demonstramos *in vitro* que a talidomida levou ao aumento na produção de IL-10 de PBMC estimulada por LPS, o que serve de confirmação do papel da talidomida como uma molécula que promove o aumento desta citocina. Um dos principais efeitos biológicos da IL-10 seria o de inibir a ação de macrófagos e células dendríticas, reduzindo sua capacidade de apresentar antígenos e de produzir citocinas (Mosser *et al.*, 2008). A IL-10 também pode agir favorecendo a ação de células NK e contribuir para a proliferação de certos subtipos de células CD8⁺ (Cai *et al.*, 1999). Algumas propostas de terapias utilizando IL-10 recombinante em humanos já foram discutidas, sendo visto que a ação local desta citocina é importante para seus efeitos antiinflamatórios do que a administração sistêmica (Mosser *et al.*, 2008).

Todo um balanço na rede de citocinas ocorre nas biópsias, e cada biópsia reflete um momento da evolução ou resolução da lesão, sendo que a análise de múltiplos fatores permite um melhor entendimento do fenômeno observado. Acreditamos também que este aumento da

expressão de TNF nas biópsias após o tratamento com talidomida possa ser resultado de um processo de ativação celular necessário para a alteração do perfil de resposta, ou o indicativo da presença de uma nova população de células com atividade moduladora na lesão em regressão. A expressão do gene para TNF por si só não pode ser encarada como indicativo de aumento da atividade pró-inflamatória na lesão biopsiada, e nos casos estudados por nós há em paralelo um aumento significativo da expressão da citocina antiinflamatória e antiangiogênica IL-10 (Kohno *et al.*, 2003), bem como o aumento da expressão do receptor de quimiocinas CCR5, já descrito como marcador de migração de células com atividade moduladora para sítios inflamatórios, o que justifica a involução das lesões e remissão dos sintomas sistêmicos (Kang *et al.*, 2007; Yurchenko *et al.*, 2006). Nos casos de rejeição causados pelo transplante de medula óssea (doença do enxerto *versus* hospedeiro), uma doença na qual a talidomida contribui para melhora do quadro de rejeição em humanos, foi relatado que a presença de células T regulatórias Foxp-3 positivas estão associadas a uma menor gravidade da doença e resposta ao tratamento (Fondi *et al.*, 2009). Apesar de não ter sido feito nenhum estudo para confirmar a correlação entre a ação benéfica da talidomida nesta doença e a ação de células reguladoras, isto nos sugere a possibilidade não de um novo mecanismo de ação, mas de uma função biológica ainda não observada no uso da talidomida.

As células T regulatórias naturais (CD4+CD25^{high}), as quais se desenvolvem no timo e regulam células T auto-reativas na periferia, e as células regulatórias “induzidas” (ex: Tr1, produtoras de IL-10 ou Th3, produtoras de TGF- β), podem se desenvolver na periferia após a exposição ao antígeno na presença de sinais específicos, como citocinas desativadoras ou drogas. Diversos estudos sugerem que sinais associados ao dano tecidual são indutores de ativação de células Treg. Células Treg naturais eficientemente controlam células T patogênicas e respostas imunes inatas, levando a redução do dano tecidual (Izcue *et al.*, 2009;

Powrie *et al.*, 2003). Os mecanismos potenciais pelos quais as células Treg regulam a inflamação parecem estar associados à redução da migração de células T efetoras do linfonodo para o sítio da inflamação ou elas parecem migrar para o sítio inflamatório para controlar as reações imunoinflamatórias (Rouse *et al.*, 2006).

O *Forkhead box P3* (FoxP3) é um fator de transcrição cuja expressão caracteriza Treg, mas estudos recentes indicam que ele também está presente em células ativadas (Zhou *et al.*, 2009; Ziegler, 2007). A confusão criada pela expressão de FoxP3 em células sem fenótipo regulatório pode ser avaliada por uma compreensão global do microambiente onde a célula FoxP3⁺ está inserida. A própria expressão de FoxP3 nas células parece ser transiente (Zhou *et al.*, 2009) e dependente de IL-2.

A análise dos nossos dados revela haver um aumento em paralelo de TGF- β , IL-10 e TNF nas biópsias, seguido de um aumento na expressão gênica de Foxp3 e IL-2 nas PBMC dos pacientes estudados. Embora o processo de desenvolvimento do ENL não seja correlacionado com o aumento da atividade específica de células T respondendo a antígenos, verificamos indícios, mesmo que superficiais, que podem ser correlacionados com um aumento da atividade destas células após o tratamento com talidomida, o que também já foi descrito por outro grupo (Haslett *et al.*, 2005).

O aumento da expressão de genes correlacionados à função das células T observado nas biópsias em regressão demonstra um perfil mais regulador do que pró-inflamatório devido ao perfil de citocinas observado, incluindo um aumento da expressão do fator de transcrição Foxp3 característico de células T reguladoras nas lesões de metade dos casos estudados juntamente com o aumento da expressão de IL-10. Realizamos alguns ensaios *in vitro* buscando entender como a talidomida pode influenciar na ativação das células T.

Demonstramos que a talidomida altera o perfil de ativação levando ao aumento na expressão do gene para IL-2 nas células T ativadas via TCR nessas culturas. Dados de nosso grupo demonstraram que o pré-tratamento de monócitos de voluntários saudáveis com talidomida inibe a resposta proliferativa ao *M. leprae* por linfócitos T CD4⁺, por um mecanismo não associado à deficiente apresentação antigênica, mas sim por aumentar a população regulatória na co-cultura (dados não mostrados). Estes fatos nos levam a indícios que a talidomida possa favorecer a atividade de células reguladoras durante o tratamento do ENL (Haslett *et al.*, 1998; Haslett *et al.*, 2005).

A participação dos neutrófilos durante o quadro do ENL também é um fato bastante marcante, uma vez que este tipo celular é abundante nas lesões e entende-se que os neutrófilos seriam os principais mediadoras da inflamação (Oliveira *et al.*, 1999). A quimiocina IL-8 é conhecida pela sua função de atrair neutrófilos para os tecidos inflamados (Mukaida, 2000) e verificamos que a expressão gênica de IL-8 está sendo reduzida nas biópsias na maioria dos nossos casos após o uso da talidomida. Além de uma possível atuação da talidomida sobre os neutrófilos, quando foi descrito que a talidomida reduz a produção de TNF induzida por LPS nestas células (Oliveira *et al.*, 1999), a redução do influxo de neutrófilos para o tecido inflamado justifica a ação rápida na regressão das lesões reacionais, e também em outros tipos de lesões teciduais mediadas por granulócitos (Yasui *et al.*, 2005). O tempo de vida dos neutrófilos nos tecidos é de 1-2 dias, logo a redução no seu influxo leva à redução do seu número no tecido de forma rápida, contribuindo para a redução do infiltrado inflamatório. Outra ação da talidomida que suporta a tese da sua ação sobre os neutrófilos é o fato observado nesta tese que há um aumento na expressão de IL-10 nas biópsias, o que pode contribuir para a desativação destas células já instaladas no sítio inflamatório, uma vez que

esta é uma propriedade conhecida da IL-10 (Sun *et al.*, 2009), contribuindo com o sucesso do uso da talidomida para o controle das lesões de pele decorrentes do ENL.

Diversos estudos discutem como o ENL se desenvolve e que citocinas pró-inflamatórias coordenam o desenvolvimento da lesão. No presente trabalho verificamos que a expressão de citocinas como o TNF, VEGF e quimiocinas tais como a IL-8 estão aumentadas durante a reação, juntamente com o aumento da microvasculatura nas lesões (Figura 21). Os estudos de microarranjo realizados na Universidade da Califórnia (Figura 19) indicam a mesma situação observada no nosso trabalho, mostrando que vias de sinalização pró-inflamatórias tais como PI3/AKT, sinalização de eicosanóides e angiogênese estão reguladas positivamente durante os episódios de reação do tipo II. Contudo, nosso estudo sobre a ação da talidomida no ENL que caminhou em um sentido oposto, verificando as alterações causadas pelo tratamento com a talidomida, nos leva a conclusões semelhantes, uma vez que verificamos genes das mesmas classes sendo modulados negativamente pela talidomida juntamente com a melhora do quadro clínico dos pacientes.

O processo de angiogênese tem sido extensivamente estudado, principalmente pela sua participação no processo de desenvolvimento e manutenção de tumores. Dos diversos passos fundamentais para a angiogênese, alguns são compartilhados pelo processo inflamatório, sendo a sinalização pró-inflamatória responsável pela ativação do endotélio vascular e migração celular os mais comuns (Folkman, 1995). A descrição da talidomida como uma droga com propriedade antiangiogênica causou um aumento no interesse desta droga até então com conhecidas propriedades sedativas e antiinflamatórias (D'Amato *et al.*, 1994). Na hanseníase ainda não havia sido correlacionado a formação de novos vasos com o processo de reação do tipo II, apesar de já ser conhecida a participação ativa de moléculas como a IL-1 β , IL8 e TNF com propriedades pró-angiogênicas. Havia sido reportada uma correlação entre o

aumento da carga bacilar e a densidade da microvasculatura cutânea nas áreas de lesões lepromatosas (Antunes *et al.*, 2000), contudo, o aparecimento das lesões de ENL ocorre em áreas diferentes, normalmente em pele sadia, o que dificulta uma correlação entre o aumento da microvasculatura nas lesões reacionais das não reacionais. Mesmo assim podemos verificar em nosso trabalho que as lesões com ENL possuem uma maior expressão do gene para VEGF-A do que as lesões multibacilares não reacionais e há um aumento na microvasculatura da derme (Figura 20), confirmando os indícios que há uma regulação positiva de fatores pró-angiogênicos durante o episódio reacional.

Verificamos então que o papel da talidomida sobre as lesões de reação tipo II também se dá pela modulação negativa, porém não homogênea de diversos fatores pró-angiogênicos. A redução na expressão da citocina IL-1 β na maioria dos casos (Figura 8), o que ainda não havia sido descrito a respeito do tratamento do ENL é um dos dados que confirma a ação antiangiogênica da talidomida sobre o ENL. A IL-1 β também é produzida por células endoteliais ativadas e a redução observada pode ser correlacionada com a redução da capacidade de TNF em ativar as células endoteliais na presença da talidomida. Já foi descrito pelo nosso grupo de pesquisa que a IL-1 β está aumentada no soro de pacientes durante o ENL, e seria um marcador de atividade inflamatória tão eficiente quanto o TNF para justificar a sintomatologia, já que compartilham diversas atividades (Sarno *et al.*, 1991). A redução na expressão do gene da enzima COX-2, responsável pela síntese de prostaglandinas e com papel pró-angiogênico em tumores juntamente com o VEGF (Toomey *et al.*, 2009), também foi encontrada na maioria dos nossos casos, o que é compatível com a descrição prévia de reduzir o tempo de meia vida do seu RNAm (Fujita *et al.*, 2001). Conforme os dados de microarranjo realizados a partir de amostras de ENL cedidas pelo nosso grupo e obtidos pelo grupo da Universidade da Califórnia, a via de síntese de eicosanóides (o que também compreende a

síntese de prostaglandinas) era uma das principais moduladas positivamente nas lesões reacionais e vemos em nossos resultados que a talidomida foi capaz de reduzir a expressão da COX-2, que é a mais importante isoforma da prostaglandina sintase induzida por processos inflamatórios. A quimiocina IL-8, além de potente atividade quimioatratora de neutrófilos conforme discutido anteriormente, também possui atividade pró-angiogênica o que também contribui para o aumento da microvasculatura descrita neste trabalho durante o ENL e que é modulada negativamente pela talidomida (Figura 21).

Em um caso de reação do tipo II, à parte daqueles em que fizemos o acompanhamento da expressão de diversos genes, podemos analisar a microvasculatura das lesões através da marcação imunohistoquímica do fator VIII da cascata de coagulação que é sintetizado principalmente no endotélio vascular e do VEGF-A, antes e após tratamento com talidomida (Figura 21A). Verificamos a marcação positiva para o fator VIII na biópsia reacional, evidenciando a presença de uma densa microvasculatura o que não acontece na pele sadia. A marcação para VEGF-A apresentou-se difusa, embora algumas células endoteliais apresentassem positividade para esta marcação, uma vez que sua fonte de produção nestas lesões seriam as células inflamatórias presentes no infiltrado inflamatório. Nesse caso, o paciente estudado apresentava severos sintomas sistêmicos e lesões reacionais por várias partes do corpo. A administração de 300 mg/dia de talidomida reduziu os sintomas sistêmicos e levou à involução das lesões existentes observado na consulta médica após uma semana de tratamento. Em uma das lesões involuídas após sete dias de tratamento, uma nova biópsia foi obtida e nela testada a marcação para fator VIII e VEGF-A mais uma vez. A redução da marcação para fator VIII evidencia a redução da densidade da microvasculatura da lesão e em paralelo observamos que a positividade na marcação para VEGF-A encontrada de forma difusa nas células do infiltrado foi reduzida. Por PCR em tempo real confirmamos que a

expressão do gene para VEGF-A era menor após tratamento com talidomida, bem como a expressão do gene para IL-8, o que também pode justificar o mecanismo anti-angiogênico da talidomida (Figura 21B).

Embora nós não identificássemos a expressão do gene para TNF sendo reduzida nas biópsias após tratamento com a talidomida na maioria dos casos, a participação deste fator é fundamental para o desenvolvimento do ENL (Sarno *et al.*, 1991). A participação do TNF como ativador das células endoteliais, dentre outros fatores com certeza é fundamental para o estabelecimento do ENL. A talidomida é capaz de modular a sua ação sobre as células endoteliais, e isto talvez possa ser observado pela redução da produção de IL-1 β nas biópsias por exemplo. Alguns trabalhos já demonstraram que a talidomida interfere na ativação do fator de transcrição NF- κ B via receptores para TNF e IL-1 β (Sampaio *et al.*, 2006), o que nos leva a acreditar que a talidomida possa estar influenciando a ativação das células do endotélio vascular na reação do tipo II. Realizamos alguns testes *in vitro* com culturas de células endoteliais de veias de cordão umbilical para verificar a ação da talidomida sobre a ativação causada pelo TNF. Foi observado que o tratamento com talidomida leva à redução na expressão de genes indicativos da ativação endotelial, tais como o próprio TNF, a enzima COX-2, VEGF-A e IL-8 (Figura 22). A redução destes fatores pró-angiogênicos estimulados por TNF também suporta a idéia da importância da angiogênese no desenvolvimento do ENL e do tratamento com a talidomida contribuindo não somente através das suas propriedades antiinflamatórias, mas também de forma antiangiogênica para melhora tão eficaz do quadro clínico dos pacientes.

A oportunidade de testar um composto sintetizado a partir da estrutura básica da talidomida nos levou a resultados promissores. O análogo LASSBio-542 foi criado pela substituição da glutarimida por um grupamento metil 2-fenoxipropanoato ligado com a

ftalimida pela posição *orto* e testado com sucesso em camundongos (Machado *et al.*, 2005). Os testes *in vitro* do análogo LASSBio-542 demonstraram sua capacidade em reduzir a produção de TNF e também de IL-10 induzidos por LPS em PBMC humana, sugerindo uma atividade diferente da talidomida que leva a um leve aumento de IL-10 em paralelo à redução de TNF.

A possibilidade de criar um medicamento como LASSBio-542, que reduz a produção de IL-10 juntamente com a produção de TNF pode ser interessante nos casos de tumores que utilizam as propriedades da IL-10 como mecanismo de escape da resposta imune anti-tumoral. A citocina IL-10, que possui atividades antiinflamatórias, tais como a de reduzir a ativação de macrófagos, a produção de citocinas do tipo Th1 e a ativação de NF- κ B, pode também ser fundamental para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer, tais como câncer de ovário e melanomas malignos (Blay *et al.*, 1993; Yue *et al.*, 1997).

Continuando nossos testes com o análogo LASSBio-542, verificamos a propriedade inibidora da ativação de NF- κ B por TNF em PBMCs humanas (Figura 22). Como já foi descrito anteriormente, o fator de transcrição NF- κ B é fundamental para a resposta pró-inflamatória, podendo ser ativado por diversos fatores que disparam a resposta imune inata ou também por citocinas inflamatórias como o TNF e IL-1 β . Diversas funções da talidomida são atribuídas a essa propriedade, bem como a atividade antiinflamatória dos salicilatos (Sampaio *et al.*, 2006). Essa função inibidora da ativação de NF- κ B descrita para o análogo LASSBio-542 também deve justificar a redução da produção de TNF descrita anteriormente e demonstra o potencial desta molécula como uma droga antiinflamatória.

A atividade do análogo LASSBio-542 foi testada sobre a ativação de células endoteliais vasculares por TNF. Em nosso ensaio *in vitro* verificamos que tal qual a

talidomida, este análogo reduz a expressão de genes envolvidos com a ativação endotelial, como TNF, IL-8, VEGF-A e COX-2 (Figura 27). Como um dos nossos objetivos era comparar o análogo com a talidomida, através dos resultados anteriores esperávamos que o análogo exibisse atividade antiangiogênica, mesmo reduzindo a produção de IL-10. Realizando um ensaio clássico para busca de moléculas com propriedades antiangiogênicas observamos o esperado, a adição do análogo LASSBio-542 à cultura de HUVEC sobre matrigel acarretou na redução da formação de estruturas tubulares (Figura 28). A atividade anti-NF- κ B provavelmente colabora com o potencial anti-angiogênico da talidomida e do composto LASSBio-542, bem como com as propriedades moduladoras do sistema imune. Contudo, esta característica não é suficiente para explicar todas as propriedades exibidas pela talidomida.

O composto LASSBio-468, cujo grupamento ftalímídico foi preservado, sofrendo uma N-substituição por um grupamento 4-(fenilsulfonil)-tiomorfolina ligado em sua posição *para* já foi testado em animais mostrando-se capaz de reduzir a indução de TNF (Lima *et al.*, 2002). No modelo testado por nós o composto LASSBio-468 não se mostrou eficaz na modulação da produção de TNF e IL-10 induzidos por LPS *in vitro*. A falta de atividade em nosso modelo não descarta o análogo testado, já que *in vivo* ele pode assumir uma configuração diferenciada, bem como ser metabolizado dando origem a compostos ativos.

A talidomida possui propriedades únicas no seu conjunto, sendo algumas compartilhadas com outras drogas, porém nem todas em uma mesma molécula. Toda essa diversidade de atividades biológicas, que variam conforme o modelo estudado também é um dos motivos pelo pouco conhecimento da correlação entre sua estrutura e atividade. A manutenção do grupamento fitalimida é sempre visto como fundamental para as atividades da talidomida que com certeza possui mais de um alvo biológico de interação intracelular.

Estudando o análogo LASSBio-542 verificamos propriedades antiinflamatórias com potência similar a talidomida, porém não podemos esperar exatamente a mesma função biológica que a droga original. A busca de análogos com funções diferenciadas é uma boa opção para desenvolvimento de moduladores do sistema imune necessários em intervenções específicas como no caso de tumores que utilizam a IL-10 como fator de crescimento (Yue *et al.*, 1997), onde possivelmente a talidomida não exerceria uma atividade satisfatória devido a sua propriedade de favorecer a produção de IL-10.

Uma questão sempre levantada é sobre a teratogenicidade de moléculas análogas à talidomida, porém acredito que esta questão é secundária visualizando as possíveis doenças em que estas moléculas seriam aplicadas. Todo o conjunto de alterações que a talidomida causa no sistema imune e também agindo como uma droga antiangiogênica a torna insegura para o uso em gestantes, uma vez que os processos de desenvolvimento compartilham diversas funções com estes sistemas tal como a migração celular e angiogênese. Vários análogos da talidomida vêm sendo testados por diversos grupos, sendo intensificado o interesse por essa molécula principalmente após a descrição como inibidora da produção de TNF e da angiogênese. Atualmente, os análogos da talidomida vêm sendo testados com sucesso na prática clínica, aumentando a sobrevivência dos pacientes acometidos pelo mieloma múltiplo. Um dos primeiros análogos a serem comercializados foi a lenalomida (comercializado como Revlimid nos EUA pela Celgene corp.), que possui uma potência bem maior que a talidomida na redução da produção de TNF, além de ser anti-angiogênico e antitumoral, sendo utilizado em associação a dexametasona ou outras drogas antitumorais tais como a doxorrubicina ou melfalam (Richardson *et al.*, 2002). Este análogo que possui alterações na porção fitalimida, quando comparado a talidomida, e mantém suas propriedades teratogênicas. Outro análogo semelhante à lenalomida é a pomalidomida (comercializado nos

EUA como Actimid pela Celgene corp.) que também é aplicada no tratamento do mieloma múltiplo (Teo, 2005). Um fato interessante é que a lenalomida e a pomalidomida possuem atividade co-estimulatória tal como a talidomida (Marriott *et al.*, 2002).

O descobrimento do ponto de partida para o desencadeamento dos eventos inflamatórios que leva ao quadro de reação do tipo II na hanseníase continua sendo um desafio. Porém o mecanismo de desenvolvimento e estabelecimento do ENL vem sendo descrito nos últimos anos como foi comentado na introdução. Verificamos com este trabalho que o acompanhamento de pacientes tratados com talidomida nos propicia meios de entender melhor esta patologia. A talidomida se mostra eficaz para redução dos sintomas gerais do ENL de forma rápida, porém não é capaz de curar todos os pacientes, impedindo que novos episódios reacionais venham se desenvolver mesmo após a carga bacilar ter sido zerada pela poliquimioterapia. A maioria dos pacientes observados neste estudo voltaram a desenvolver o ENL após o término do tratamento com talidomida, necessitando de novos ciclos de talidomida sozinha ou em conjunto com prednisona. Alguns destes pacientes apresentam diversos quadros de reação e necessitam receber tratamento antiinflamatório contínuo, quer seja por doses baixas da talidomida (100 mg/dia) ou corticóides, sob pena de voltar a desenvolver o ENL caso interrompam o tratamento. No entanto, o uso da talidomida como droga de escolha para o tratamento dos episódios de ENL grave não deve ser descartado, devido a sua rápida ação para o controle da doença que pode levar a seqüelas irreversíveis.

Verificamos neste trabalho que o processo de angiogênese durante o ENL é fundamental para o estabelecimento das lesões nodulares e que a remissão destas pela talidomida está correlacionada com a sua atividade antiangiogênica juntamente com a modulação do sistema imune que contribui para a melhora dos sintomas sistêmicos dos pacientes. O aumento da expressão de TNF observado não parece influenciar de forma

negativa a melhora dos pacientes uma vez que sua ação pode estar sendo bloqueada pela ação da própria talidomida como demonstrado *in vitro* (Figura 18). Embora não avaliamos o nível sérico de TNF nos pacientes tratados, extensos estudos prévios do nosso próprio grupo verificaram que há uma redução nestes níveis após o tratamento com talidomida (Sampaio *et al.*, 1993).

O microambiente das lesões reacionais é bastante complexo, regulado por diversas moléculas ao mesmo tempo, e devemos ainda levar em conta todo o diferencial genético que cada paciente possui. A dificuldade de conseguir um padrão de expressão gênica nos casos é facilmente entendida, já que até as lesões estudadas e o grau de evolução/involução de cada uma não tem como ser controlada, apesar de todo cuidado da equipe médica experiente na escolha das lesões. A correlação que tentamos estabelecer sobre a atividade das células reguladoras e a ação da talidomida deve ser estudada de forma mais complexa, levando em conta a pesquisa *in vivo* por resultados que comprovem o aumento da população de células T reg, ou o favorecimento do seu desenvolvimento e atividade na presença da talidomida em estudos *in vitro* e *in vivo*. Porém, esta é uma possibilidade que não deve ser descartada sem estudos prévios, pois outros trabalhos demonstram que a talidomida pode agir contribuindo para a ativação de células T em paralelo as suas propriedades antiinflamatórias.

6. REFERÊNCIAS

- Antunes, S. L., Motta, E., de Almeida, S. M., Gallo, M. E., Nery, J. A., & Lenzi, H. L. 2000. Distinct patterns of microvasculature in the cutaneous lesions of leprosy. *Int.J.Lepr.Other Mycobact.Dis.*, 68(2): 143-151, 2000.
- Appay, V. & Rowland-Jones, S. L. 2001. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.*, 22(2): 83-87, 2001.
- Arlen, R. R. & Wells, P. G. 1996. Inhibition of thalidomide teratogenicity by acetylsalicylic acid: evidence for prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation of thalidomide to a teratogenic reactive intermediate. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 277(3): 1649-1658, 1996.
- Benjamin, L. E., Hemo, I., & Keshet, E. 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*, 125(9): 1591-1598, 1998.
- Bernardini, G., Ribatti, D., Spinetti, G., Morbidelli, L., Ziche, M., Santoni, A., Capogrossi, M. C., & Napolitano, M. 2003. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J.Immunol.Methods*, 273(1-2): 83-101, 2003.
- Bhandarkar, S. S., Cohen, C., Kuruvila, M., Rea, T. H., Mackelfresh, J. B., Lee, D. J., Modlin, R. L., & Arbiser, J. L. 2007. Angiogenesis in cutaneous lesions of leprosy: implications for treatment. *Arch.Dermatol.*, 143(12): 1527-1529, 2007.
- Blay, J. Y., Burdin, N., Rousset, F., Lenoir, G., Biron, P., Philip, T., Banchereau, J., & Favrot, M. C. 1993. Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. *Blood*, 82(7): 2169-2174, 1993.
- Bloom, B. R., Modlin, R. L., & Salgame, P. 1992. Stigma variations: observations on suppressor T cells and leprosy. *Annu.Rev.Immunol.*, 10: 453-488, 1992.
- Botting, J. 2002. The History of Thalidomide. *Drug News Perspect.*, 15(9): 604-611, 2002.
- Britton, W. J. & Lockwood, D. N. 2004. Leprosy. *Lancet*, 363(9416): 1209-1219, 2004.
- Burke, P. A. & DeNardo, S. J. 2001. Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 39(1-2): 155-171, 2001.
- Cai, G., Kastelein, R. A., & Hunter, C. A. 1999. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *Eur.J.Immunol.*, 29(9): 2658-2665, 1999.
- Calabrese, L. & Fleischer, A. B. 2000. Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am.J.Med.*, 108(6): 487-495, 2000.

- Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat.Med.*, 9(6): 653-660, 2003.
- Carmeliet, P. & Jain, R. K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801): 249-257, 2000.
- Carvalho, D. S., Seixas, F. R., Sarno, E. N., & Sampaio, E. P. 2007. Patents in targets and drugs for unbalanced cytokine and chemokine network mediated disorders. *Recent Pat Inflamm.Allergy Drug Discov.*, 1(3): 176-182, 2007.
- Cherukuri, D. P., Goulet, A. C., Inoue, H., & Nelson, M. A. 2005. Selenomethionine Regulates Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression through Nuclear Factor-kappa B (NF-kappaB) in Colon Cancer Cells. *Cancer Biol.Ther.*, 4(2): 2005.
- Chung, F., Palmer, B. D., Muller, G. W., Man, H. W., Kestell, P., Baguley, B. C., & Ching, L. M. 2003. Effect of 3-fluorothalidomide and 3-methylthalidomide enantiomers on tumor necrosis factor production and antitumor responses to the antivascular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA). *Oncol.Res.*, 14(2): 75-82, 2003.
- Conway, E. M., Collen, D., & Carmeliet, P. 2001. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc.Res.*, 49(3): 507-521, 2001.
- Corral, L. G. & Kaplan, G. 1999. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. *Ann.Rheum.Dis.*, 58 Suppl 1: I107-I113, 1999.
- D'Amato, R. J., Loughnan, M. S., Flynn, E., & Folkman, J. 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 91(9): 4082-4085, 1994.
- Dolev, E. 2001. [The thalidomide story and its lessons]. *Harefuah*, 140(7): 663-667, 2001.
- Esquenazi, D. A., Sampaio, E. P., Moreira, A. L., Gallo, M. E., Almeida, S. M., & Sarno, E. N. 1990. Effect of treatment on immune responsiveness in lepromatous leprosy patients. *Lepr.Rev.*, 61(3): 251-257, 1990.
- Fan, T. P., Yeh, J. C., Leung, K. W., Yue, P. Y., & Wong, R. N. 2006. Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends Pharmacol.Sci.*, 27(6): 297-309, 2006.
- Faure, M., Thivolet, J., & Gaucherand, M. 1980. Inhibition of PMN leukocytes chemotaxis by thalidomide. *Arch.Dermatol.Res.*, 269(3): 275-280, 1980.
- Faver, I. R., Guerra, S. G., Su, W. P., & el-Azhary, R. 2005. Thalidomide for dermatology: a review of clinical uses and adverse effects. *Int.J.Dermatol.*, 44(1): 61-67, 2005.
- Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat.Med.*, 1(1): 27-31, 1995.
- Folkman, J. & Shing, Y. 1992. Angiogenesis. *J.Biol.Chem.*, 267(16): 10931-10934, 1992.
- Fondi, C., Nozzoli, C., Benemei, S., Baroni, G., Saccardi, R., Guidi, S., Nicoletti, P., Bartolozzi, B., Pimpinelli, N., Santucci, M., Bosi, A., & Massi, D. 2009. Increase in FOXP3+

regulatory T cells in GVHD skin biopsies is associated with lower disease severity and treatment response. *Biol.Blood Marrow Transplant.*, 15(8): 938-947, 2009.

Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. 2005a. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat.Immunol.*, 6(11): 1142-1151, 2005a.

Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G., & Rudensky, A. Y. 2005b. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.*, 22(3): 329-341, 2005b.

Franklin, S. L., Ferry, R. J., Jr., & Cohen, P. 2003. Rapid insulin-like growth factor (IGF)-independent effects of IGF binding protein-3 on endothelial cell survival. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 88(2): 900-907, 2003.

Franks, M. E., MacPherson, G. R., & Figg, W. D. 2004. Thalidomide. *Lancet*, 363(9423): 1802-1811, 2004.

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. *Clin.Cancer Res.*, 7(11): 3349-3355, 2001.

Gallo, M. E. N., Sampaio, E. P., Nery, J. A. C., Moraes, M. O., Antunes, S. L. G., Pessolani, M. C. V., & Sarno, E. N. 2005. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. *Coura, J.R. (ed.) Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*: 1383-1394. Guanabara Koogan.

Geginat, J., Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. 2001. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J.Exp.Med.*, 194(12): 1711-1719, 2001.

Gillitzer, R. & Goebeler, M. 2001. Chemokines in cutaneous wound healing. *J.Leukoc.Biol.*, 69(4): 513-521, 2001.

Gutschow, M., Hecker, T., Thiele, A., Hauschildt, S., & Eger, K. 2001. Aza analogues of thalidomide: synthesis and evaluation as inhibitors of tumor necrosis factor-alpha production in vitro. *Bioorg.Med.Chem.*, 9(4): 1059-1065, 2001.

Hall, V. C., El-Azhary, R. A., Bouwhuis, S., & Rajkumar, S. V. 2003. Dermatologic side effects of thalidomide in patients with multiple myeloma. *J.Am.Acad.Dermatol.*, 48(4): 548-552, 2003.

Hancock, W. W., Wang, L., Ye, Q., Han, R., & Lee, I. 2003. Chemokines and their receptors as markers of allograft rejection and targets for immunosuppression. *Curr.Opin.Immunol.*, 15(5): 479-486, 2003.

Hasan, Z., Shah, B. H., Mahmood, A., Young, D. B., & Hussain, R. 2003. The effect of mycobacterial virulence and viability on MAP kinase signalling and TNF alpha production by human monocytes. *Tuberculosis.(Edinb.)*, 83(5): 299-309, 2003.

- Haslett, P. A., 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. *J.Exp.Med.*, 187(11): 1885-1892, 1998.
- Haslett, P. A., Hanekom, W. A., Muller, G., & Kaplan, G. 2003. Thalidomide and a thalidomide analogue drug costimulate virus-specific CD8+ T cells in vitro. *J.Infect.Dis.*, 187(6): 946-955, 2003.
- 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. *J.Infect.Dis.*, 192(12): 2045-2053, 2005.
- Hasper, M. F. & Klokke, A. H. 1982. Thalidomide in the treatment of chronic discoid lupus erythematosus. *Acta Derm.Venereol.*, 62(4): 321-324, 1982.
- Helmy, H. S., Pearson, J. M., & Waters, M. F. 1971. Treatment of moderately severe erythema nodosum leprosum with clofazimine--a controlled trial. *Lepr.Rev.*, 42(3): 167-177, 1971.
- Heney, D., Lewis, I. J., & Bailey, C. C. 1988. Thalidomide for chronic graft-versus-host disease in children. *Lancet*, 2(8623): 1317, 1988.
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T., & De Bruijn, E. A. 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol.Rev.*, 56(4): 549-580, 2004.
- Hunter, S. W. & Brennan, P. J. 1981. A novel phenolic glycolipid from Mycobacterium leprae possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J.Bacteriol.*, 147(3): 728-735, 1981.
- Izcue, A., Coombes, J. L., & Powrie, F. 2009. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu.Rev.Immunol.*, 27: 313-338, 2009.
- Jain, R. K. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat.Med.*, 9(6): 685-693, 2003.
- James, J. S. 1995. Thalidomide for wasting syndrome: progress toward compromise. *AIDS Treat.News*,(no 234): 1-5, 1995.
- Jayapal, V., Selvibai, G., Mahalakshmi, K., Pushkala, Regunath, K., & Subramanian, S. 2001. Comparative study of anti-PGL-1, anti-35 kDa and anti-lipoarabinomannan assays for serodiagnosis of leprosy. *Indian J.Lepr.*, 73(3): 229-237, 2001.
- Kahawita, I. P. & Lockwood, D. N. 2008. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, 102(4): 329-337, 2008.
- Kallikourdis, M., Andersen, K. G., Welch, K. A., & Betz, A. G. 2007. Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 104(2): 594-599, 2007.

- Kang, S. G., Piniacki, R. J., Hogenesch, H., Lim, H. W., Wiebke, E., Braun, S. E., Matsumoto, S., & Kim, C. H. 2007. Identification of a chemokine network that recruits FoxP3(+) regulatory T cells into chronically inflamed intestine. *Gastroenterology*, 132(3): 966-981, 2007.
- Kang, T. J. & Chae, G. T. 2001. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 31(1): 53-58, 2001.
- Kaplan, G. 2000. Potential of thalidomide and thalidomide analogues as immunomodulatory drugs in leprosy and leprosy reactions. *Lepr.Rev.*, 71 Suppl: S117-S120, 2000.
- Kaplan, G., Laal, S., Sheftel, G., Nusrat, A., Nath, I., Mathur, N. K., Mishra, R. S., & Cohn, Z. A. 1988. The nature and kinetics of a delayed immune response to purified protein derivative of tuberculin in the skin of lepromatous leprosy patients. *J.Exp.Med.*, 168(5): 1811-1824, 1988.
- Keifer, J. A., Guttridge, D. C., Ashburner, B. P., & Baldwin, A. S., Jr. 2001. Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. *J.Biol.Chem.*, 276(25): 22382-22387, 2001.
- Knobloch, J., Schmitz, I., Gotz, K., Schulze-Osthoff, K., & Ruther, U. 2008. Thalidomide induces limb anomalies by PTEN stabilization, Akt suppression, and stimulation of caspase-dependent cell death. *Mol.Cell Biol.*, 28(2): 529-538, 2008.
- Kohno, T., Mizukami, H., Suzuki, M., Saga, Y., Takei, Y., Shimpo, M., Matsushita, T., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Sato, I., & Ozawa, K. 2003. Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. *Cancer Res.*, 63(16): 5091-5094, 2003.
- Lee, M., Aoki, M., Kondo, T., Kobayashi, K., Okumura, K., Komori, K., & Murohara, T. 2005. Therapeutic angiogenesis with intramuscular injection of low-dose recombinant granulocyte-colony stimulating factor. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 25(12): 2535-2541, 2005.
- Lima, L. M., Castro, P., Machado, A. L., Fraga, C. A., Lugnier, C., de, M., V, & Barreiro, E. J. 2002. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. *Bioorg.Med.Chem.*, 10(9): 3067-3073, 2002.
- Little, D., Khanolkar-Young, S., Coulthart, A., Suneetha, S., & Lockwood, D. N. 2001. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect.Immun.*, 69(5): 3413-3417, 2001.
- Lockwood, D. N. 1996. The management of erythema nodosum leprosum: current and future options. *Lepr.Rev.*, 67(4): 253-259, 1996.
- Loetscher, P., Uguccioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C., & Dayer, J. M. 1998. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*, 391(6665): 344-345, 1998.

Machado, A. L., Lima, L. M., raujo-Jr, J. X., Fraga, C. A., Goncalves, K., V., & Barreiro, E. J. 2005. Design, synthesis and antiinflammatory activity of novel phthalimide derivatives, structurally related to thalidomide. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 15(4): 1169-1172, 2005.

Majumdar, S., Lamothe, B., & Aggarwal, B. B. 2002. Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H2O2, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. *J.Immunol.*, 168(6): 2644-2651, 2002.

Manandhar, R., Shrestha, N., Butlin, C. R., & Roche, P. W. 2002. High levels of inflammatory cytokines are associated with poor clinical response to steroid treatment and recurrent episodes of type 1 reactions in leprosy. *Clin.Exp.Immunol.*, 128(2): 333-338, 2002.

Marriott, J. B., Clarke, I. A., Dredge, K., Muller, G., Stirling, D., & Dalgleish, A. G. 2002. Thalidomide and its analogues have distinct and opposing effects on TNF-alpha and TNFR2 during co-stimulation of both CD4(+) and CD8(+) T cells. *Clin.Exp.Immunol.*, 130(1): 75-84, 2002.

Matthews, S. J. & McCoy, C. 2003. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clin.Ther.*, 25(2): 342-395, 2003.

McHugh, S. M. & Rowland, T. L. 1997. Thalidomide and derivatives: immunological investigations of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) inhibition suggest drugs capable of selective gene regulation. *Clin.Exp.Immunol.*, 110(2): 151-154, 1997.

Mehra, V., Brennan, P. J., Rada, E., Convit, J., & Bloom, B. R. 1984. Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique M. leprae glycolipid. *Nature*, 308(5955): 194-196, 1984.

Moraes, M. O., Sarno, E. N., Almeida, A. S., Saraiva, B. C., Nery, J. A., Martins, R. C., & Sampaio, E. P. 1999. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand.J.Immunol.*, 50(5): 541-549, 1999.

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. *J.Invest Dermatol.*, 115(6): 935-941, 2000.

Moreira, A. L., Sampaio, E. P., Zmuidzinas, A., Frindt, P., Smith, K. A., & Kaplan, G. 1993. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J.Exp.Med.*, 177(6): 1675-1680, 1993.

Moreira, A. M. S., Takiya, C. M., de Arruda, L. B., Pascarelli, B., Gomes, R. N., Castro Faria Neto, H. C., Lima, L. M., & Barreiro, E. J. 2005. LASSBio-468: a new achiral thalidomide analogue which modulates TNF-alpha and NO production and inhibits endotoxic shock and arthritis in an animal model. *Int.Immunopharmacol.*, 5(3): 485-494, 2005.

Mosser, D. M. & Zhang, X. 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol.Rev.*, 226: 205-218, 2008.

- Mukaida, N. 2000. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int.J.Hematol.*, 72(4): 391-398, 2000.
- Murphy, G. F., Sanchez, N. P., Flynn, T. C., Sanchez, J. L., Mihm, M. C., Jr., & Soter, N. A. 1986. Erythema nodosum leprosum: nature and extent of the cutaneous microvascular alterations. *J.Am.Acad.Dermatol.*, 14(1): 59-69, 1986.
- Newton, R., Hart, L., Chung, K. F., & Barnes, P. J. 2000. Ceramide induction of COX-2 and PGE(2) in pulmonary A549 cells does not involve activation of NF-kappaB. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 277(3): 675-679, 2000.
- Niwayama, S., Loh, C., Turk, B. E., Liu, J. O., Miyachi, H., & Hashimoto, Y. 1998. Enhanced potency of perfluorinated thalidomide derivatives for inhibition of LPS-induced tumor necrosis factor-alpha production is associated with a change of mechanism of action. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 8(9): 1071-1076, 1998.
- Offidani, M., Corvatta, L., Marconi, M., Malerba, L., Mele, A., Olivieri, A., Brunori, M., Catarini, M., Candela, M., Capelli, D., Montanari, M., Rupoli, S., & Leoni, P. 2004. Common and rare side-effects of low-dose thalidomide in multiple myeloma: focus on the dose-minimizing peripheral neuropathy. *Eur.J.Haematol.*, 72(6): 403-409, 2004.
- Oliveira, R. B., Moraes, M. O., Oliveira, E. B., Sarno, E. N., Nery, J. A., & Sampaio, E. P. 1999. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. *J.Leukoc.Biol.*, 65(3): 364-371, 1999.
- Oliveira, R. B., Ochoa, M. T., Sieling, P. A., Rea, T. H., Rambukkana, A., Sarno, E. N., & Modlin, R. L. 2003. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect.Immun.*, 71(3): 1427-1433, 2003.
- Peterson, P. K., Hu, S., Sheng, W. S., Kravitz, F. H., Molitor, T. W., Chatterjee, D., & Chao, C. C. 1995. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor-alpha production by lipopolysaccharide- and lipoarabinomannan-stimulated human microglial cells. *J.Infect.Dis.*, 172(4): 1137-1140, 1995.
- Powrie, F., Read, S., Mottet, C., Uhlig, H., & Maloy, K. 2003. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Novartis.Found.Symp.*, 252: 92-98, 2003.
- Rajkumar, S. V. 2000. Thalidomide in multiple myeloma. *Oncology (Huntingt)*, 14(12 Suppl 13): 11-16, 2000.
- Reynolds, L. P., Killilea, S. D., & Redmer, D. A. 1992. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J.*, 6(3): 886-892, 1992.
- Rhen, T. & Cidlowski, J. A. 2005. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N.Engl.J.Med.*, 353(16): 1711-1723, 2005.
- Richardson, P. G., Schlossman, R. L., Weller, E., Hideshima, T., Mitsiades, C., Davies, F., LeBlanc, R., Catley, L. P., Doss, D., Kelly, K., McKenney, M., Mechlowicz, J., Freeman, A., Deocampo, R., Rich, R., Ryoo, J. J., Chauhan, D., Balinski, K., Zeldis, J., & Anderson, K. C.

2002. Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood*, 100(9): 3063-3067, 2002.

Ridley, D. S. & Jopling, W. H. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int.J.Lepr.Other Mycobact.Dis.*, 34(3): 255-273, 1966.

Rouse, B. T., Sarangi, P. P., & Suvas, S. 2006. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol.Rev.*, 212: 272-286, 2006.

Salgame, P., Yamamura, M., Bloom, B. R., & Modlin, R. L. 1992. Evidence for functional subsets of CD4+ and CD8+ T cells in human disease: lymphokine patterns in leprosy. *Chem.Immunol.*, 54: 44-59, 1992.

Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur.J.Immunol.*, 29(5): 1617-1625, 1999.

Sampaio, E. P., Carvalho, D. S., Nery, J. A. C. E. N., Lopes, U. G. a. E. P., & Sarno, E. N. 2006. Thalidomide: An Overview of its Pharmacological Mechanisms of Action. *Anti-Infl.& Anti-All.Ag.in M.Chem.*, 5(1): 71-77, 2006.

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 α production in vitro. *Biomed.Pharmacother.*, 56(1): 13-19, 2002.

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. *J.Infect.Dis.*, 168(2): 408-414, 1993.

Sampaio, E. P., Moraes, M. O., Nery, J. A., Santos, A. R., Matos, H. C., & Sarno, E. N. 1998a. Pentoxifylline decreases in vivo and in vitro tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). *Clin.Exp.Immunol.*, 111(2): 300-308, 1998a.

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. *J.Exp.Med.*, 175(6): 1729-1737, 1992.

Sampaio, E. P. & Sarno, E. N. 1998b. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, 31(1): 69-76, 1998b.

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. *J.Exp.Med.*, 173(3): 699-703, 1991.

Sarno, E. N., Grau, G. E., Vieira, L. M., & Nery, J. A. 1991. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin.Exp.Immunol.*, 84(1): 103-108, 1991.

- Schlesinger, L. S. & Horwitz, M. A. 1990. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. *J.Clin.Invest*, 85(4): 1304-1314, 1990.
- Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., & Williams, D. L. 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clin.Microbiol.Rev.*, 19(2): 338-381, 2006.
- Scollard, D. M., Lathrop, G. W., & Truman, R. W. 1996. Infection of distal peripheral nerves by *M. leprae* in infected armadillos; an experimental model of nerve involvement in leprosy. *Int.J.Leprosy.Other Mycobact.Dis.*, 64(2): 146-151, 1996.
- Shannon, E. J., Morales, M. J., & Sandoval, F. 1997. Immunomodulatory assays to study structure-activity relationships of thalidomide. *Immunopharmacology*, 35(3): 203-212, 1997.
- Sheskin, J. 1965. THALIDOMIDE IN THE TREATMENT OF LEPRA REACTIONS. *Clin.Pharmacol.Ther.*, 40: 303-306, 1965.
- Sheskin, J. 1966. [Treatment of the leprosy reaction with thalidomide. (A double-blind study). Preliminary report]. *Hautarzt*, 17(12): 548-549, 1966.
- Sheskin, J. 1975. [Treatment of prurigo nodularis Hyde using thalidomide]. *Hautarzt*, 26(4): 215-217, 1975.
- Slogoff, M. I., Ethridge, R. T., Rajaraman, S., & Evers, B. M. 2004. COX-2 inhibition results in alterations in nuclear factor (NF)-kappaB activation but not cytokine production in acute pancreatitis. *J.Gastrointest.Surg.*, 8(4): 511-519, 2004.
- Souza, V. N. B. & Pereira, A. C. 2007. Genética humana na susceptibilidade à hanseníase. *Hansenologia Internationalis*, 32(1)(81): 93, 2007.
- Stephens, T. D., Bunde, C. J., & Fillmore, B. J. 2000. Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. *Biochem.Pharmacol.*, 59(12): 1489-1499, 2000.
- Sun, L., Guo, R. F., Newstead, M. W., Standiford, T. J., Macariola, D. R., & Shanley, T. P. 2009. Effect of IL-10 on neutrophil recruitment and survival after *Pseudomonas aeruginosa* challenge. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, 41(1): 76-84, 2009.
- Szekanecz, Z. & Koch, A. E. 2007. Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat.Clin.Pract.Rheumatol.*, 3(11): 635-643, 2007.
- Teo, S. K. 2005. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. *AAPS.J.*, 7(1): E14-E19, 2005.
- Thomas, D. A. & Kantarjian, H. M. 2000. Current role of thalidomide in cancer treatment. *Curr.Opin.Oncol.*, 12(6): 564-573, 2000.
- Toomey, D. P., Murphy, J. F., & Conlon, K. C. 2009. COX-2, VEGF and tumour angiogenesis. *Surgeon.*, 7(3): 174-180, 2009.

- Tseng, S., Pak, G., Washenik, K., Pomeranz, M. K., & Shupack, J. L. 1996. Rediscovering thalidomide: a review of its mechanism of action, side effects, and potential uses. *J.Am.Acad.Dermatol.*, 35(6): 969-979, 1996.
- Uyemura, K., Band, H., Ohmen, J., Brenner, M. B., Rea, T. H., & Modlin, R. L. 1991. Gamma delta T cells in leprosy lesions. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 173: 203-207, 1991.
- Van Veen, N. H., Lockwood, D. N., van Brakel, W. H., Ramirez, J., Jr., & Richardus, J. H. 2009. Interventions for erythema nodosum leprosum. *Cochrane.Database.Syst.Rev.*,(3): CD006949, 2009.
- Weber, D. 2003. Thalidomide and its derivatives: new promise for multiple myeloma. *Cancer Control*, 10(5): 375-383, 2003.
- WHO. Global leprosy situation. Weekly epidemiological record. 25[82], 225-232. Disponível em: <http://www.who.int/wer>. Acesso em: 25 mai. 2009.
- Wnendt, S., Finkam, M., Winter, W., Ossig, J., Raabe, G., & Zwingenberger, K. 1996. Enantioselective inhibition of TNF-alpha release by thalidomide and thalidomide-analogues. *Chirality*, 8(5): 390-396, 1996.
- Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R. J., Weinberg, K., Rea, T. H., Bloom, B. R., & Modlin, R. L. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, 254(5029): 277-279, 1991.
- Yasui, K., Kobayashi, N., Yamazaki, T., & Agematsu, K. 2005. Thalidomide as an immunotherapeutic agent: the effects on neutrophil-mediated inflammation. *Curr.Pharm.Des*, 11(3): 395-401, 2005.
- Yue, F. Y., Dummer, R., Geertsen, R., Hofbauer, G., Laine, E., Manolio, S., & Burg, G. 1997. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int.J.Cancer*, 71(4): 630-637, 1997.
- Yurchenko, E., Tritt, M., Hay, V., Shevach, E. M., Belkaid, Y., & Piccirillo, C. A. 2006. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of Leishmania major infection favors pathogen persistence. *J.Exp.Med.*, 203(11): 2451-2460, 2006.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S. L., Jeker, L. T., Penaranda, C., Martinez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., & Bluestone, J. A. 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat.Immunol.*, 2009.
- Ziegler, S. F. 2007. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur.J.Immunol.*, 37(1): 21-23, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)