

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Victor Soares Cavalcante Costa

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E  
TOXICIDADE AGUDA E SUB-CRÔNICA DE ANÁLOGOS DE  
TALIDOMIDA CONTENDO DIAMINAS E ESTRUTURA  
FTALIMÍDICA ABERTA**

Juiz de Fora

2013

Victor Soares Cavalcante Costa

**Avaliação da atividade antiinflamatória e toxicidade aguda e sub-crônica de análogos de talidomida contendo diaminas e estrutura ftalimídica aberta**

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

Orientador: Prof.Dr.Henrique Couto Teixeira

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>.Nadia Rezende Barbosa Raposo

Juiz de Fora

2013

Soares Cavalcante Costa, Victor .  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E TOXICIDADE AGUDA  
E SUB-CRÔNICA DE ANÁLOGOS DE TALIDOMIDA CONTENDO DIAMINAS E  
ESTRUTURA FTALIMÍDICA ABERTA / Victor Soares Cavalcante  
Costa. -- 2013.  
117 p.

Orientador: Henrique Couto Teixeira  
Coorientadora: Nadia Rezende Barbosa Raposo  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2013.

1. Estrutura molecular da talidomida. 2. Representação  
estrutural dos grupamentos da talidomida e seus enantiômeros.  
3. Representação molecular dos análogos da talidomida GI-16 e  
SC-15.. 4. Avaliação de edema de pata após estímulo inflamatório  
com carragenina. 5. Avaliação da inflamação pulmonar após  
estímulo com LPS. I. Couto Teixeira, Henrique, orient. II.  
Rezende Barbosa Raposo, Nadia , coorient. III. Título.

Victor Soares Cavalcante Costa

**Avaliação da atividade antiinflamatória e toxicidade aguda e sub-crônica de análogos de talidomida contendo diaminas e estrutura ftalimídica aberta**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de concentração em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

Aprovada em 06 de agosto de 2013.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira (Orientador)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva  
Universidade Federal de Uberlândia

---

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo  
Universidade Federal de Juiz de Fora

*Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio incondicional, ao meu orientador Henrique Teixeira pela ajuda e disponibilidade, a equipe do laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e aos leitores deste trabalho pelo interesse em expandir seus conhecimentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos órgãos financiadores do projeto, *FAPEMIG e CAPES*.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas na área de concentração em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, pela oportunidade em expandir meus conhecimentos nesta área tão magnífica e que contribui para o avanço científico e intelectual das pessoas que neste mundo vivem.

Ao meu orientador *Henrique Couto Teixeira*, pela paciência e disponibilidade em me orientar.

Aos alunos de iniciação científica e a toda equipe do laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela ajuda na execução dos experimentos, pelas conversas e demonstrações de amizade.

Aos meus pais, pelo apoio e palavras de incentivo.

A Deus, por tornar tudo isso possível.

## RESUMO

A talidomida é conhecida por sua atividade antiinflamatória e imunomoduladora, controlando os sinais clínicos das doenças mais variadas, dentre elas o eritema nodoso leproso, doença de Crohn, artrite reumatóide, câncer, entre outros distúrbios vasculares e inflamatórios. Estudo anterior realizado em nosso laboratório mostrou que análogos da talidomida contendo diaminas e estrutura ftalimídica aberta são capazes de inibir *in vitro* a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, IFN- $\gamma$ , CXCL9, CXCL10 e CD80, além de elevar os níveis de IL-10. Neste estudo, a atividade antiinflamatória de dois análogos de talidomida (GI-16 e SC-15) foi avaliada *in vivo*, utilizando o modelo de inflamação na pata induzido por injeção subplantar de carragenina em camundongos BALB/c, e o modelo de inflamação pulmonar induzida por inoculação intratraqueal com LPS em camundongos C57Bl/6. Além disso, a toxicidade aguda e sub-crônica destes compostos foi avaliada em ratos Wistar. Os resultados mostram que o tratamento com GI-16 (10mg/kg e 50mg/kg) e SC-15 (50mg/kg) reduziu significativamente (53-77%) o edema de pata induzido pela injeção subplantar de carragenina 2% por até 24 horas. No modelo de inflamação pulmonar com LPS (200 $\mu$ g/ml), os compostos GI-16 (20mg/kg e 50mg/kg) e SC-15 (50mg/kg) inibiram significativamente a produção de TNF- $\alpha$  (34%) e IL-6 (66% a 89%) no homogenato pulmonar dos animais testados. O composto SC-15 (50mg/kg) e a talidomida (50mg/kg) causaram aumento dos níveis de IL-10 ( $p < 0,05$ ). Conforme esperado, a talidomida e o fármaco de referência dexametasona provocaram inibição significativa do edema de pata induzido por carragenina, assim como redução dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 induzidos pela administração de LPS. Análises histopatológicas revelaram que o tratamento com GI-16 causou redução da inflamação induzida por LPS, havendo discreta congestão capilar. Por outro lado, animais tratados com SC-15 mostraram um quadro inflamatório de moderado a intenso, A análise histopatológica dos pulmões dos camundongos apenas estimulados com LPS demonstrou quadro inflamatório de moderado a intenso, sendo detectado espessamento da parede alveolar e congestão vascular, na dose de 20mg/kg, com redução do quadro inflamatório quando aplicada a dose de 50mg/kg.

Ratos Wistar fêmeas e machos administrados com GI-16 e SC-15 (20mg/kg) não desenvolveram sinais clínicos de toxicidade aguda (dose única) ou de toxicidade sub-crônica (doses em dias alternados por 28 dias), imediatamente ou durante o período pós-tratamento. Não houve mortalidade durante os períodos de tratamento avaliados. O ganho de peso corporal ao longo do tempo foi semelhante entre os grupos sem alteração significativa nos parâmetros bioquímicos ou hematológicos. Os cortes histológicos de tecido cardíaco, hepático e renal dos ratos estudados não mostraram alterações sob a microscopia ótica comum de campo claro. Em conjunto, os resultados indicam uma forte atividade antiinflamatória dos compostos GI-16 e SC-15, não havendo sinais de toxicidade aguda ou sub-crônica, o que os torna drogas promissoras para o tratamento de doenças inflamatórias.

**Palavras-chave:** Talidomida, análogos da talidomida, inflamação, TNF- $\alpha$ , toxicidade aguda, toxicidade sub-crônica.



## ABSTRACT

Thalidomide exhibits anti-inflammatory and immunomodulatory effects, improving clinical symptoms in a variety of diseases, including erythema nodosum leprosum, Crohn disease, rheumatoid arthritis, cancer and other vascular and inflammatory diseases. In previous study from our laboratory it has been shown that thalidomide analogues containing diamines and open phthalimide structure, showed high inhibitory in vitro activity on key molecules such as TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-6, CXCL9, CXCL10 and CD80. In contrast, some compounds induced an increase in IL-10 production. In this study, the anti-inflammatory activity of two thalidomide analogues (GI-16 and SC-15) were evaluated in vivo using the carrageenan-induced paw inflammation on BALB/c mouse and the LPS-induced lung inflammation in C57Bl/6 mice. In addition, the acute and sub-chronic toxicity of the compounds on Wistar rats were evaluated. The treatment with both GI-16 (10mg/kg and 50mg/kg) and SC-15 (50mg/kg) reduced significantly (53-77%) the paw oedema over 24h evoked by subplantar injection of 2% carrageenan. GI-16 (20mg/kg and 50mg/kg) and SC-15 (50mg/kg) greatly inhibited LPS-induced TNF- $\alpha$  (around 34%) and IL-6 (66-89%) in lung homogenate. In contrast, thalidomide (50mg/kg) and SC-15 (50mg/kg) enhanced IL-10 ( $p < 0,05$ ). As expected, thalidomide and the reference drug, dexamethasone, caused significant inhibition of both carrageenan-induced oedema and of TNF- $\alpha$  and IL-6 production 24 h after intratracheal administration of LPS (200ug/ml). Histopathological analysis has shown that GI-16 treatment induced reduction in LPS-induced inflammation characterized by discrete capillary congestion. In contrast, animals treated with SC-15, showed moderate to intense inflammatory infiltrate, thickening of alveolar wall and vascular congestion at 20mg/kg, and reduced inflammation at 50mg/kg. Female and male Wistar rats administered with GI-16 and SC-15 (20mg/kg) did not develop any clinical signs of acute toxicity (single dose) or sub-chronic toxicity (every other day for 28 days) either immediately or during the post-treatment period. No mortality occurred in both, control and treated animals either immediately or during the treatment period. Body weight gain over time

was similar in all groups. There was not significant alteration in biochemical or hematological parameters. Sections of heart, liver and kidneys tissues of the studied rats showed no pathological alterations under light microscopy. These results strongly reinforce the anti-inflammatory effects of GI-16 and SC-15, which make them very attractive drug candidates to treat a broad range of inflammatory diseases.

**Key-words:** Thalidomide, thalidomide analogues, inflammation, TNF- $\alpha$ , acute toxicity, sub-chronic toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular da talidomida.....	19
Figura 2	Grupamentos da talidomida e seus enantiômeros.....	21
Figura 3	Principais metabólitos <i>in vivo</i> da talidomida.....	22
Figura 4	Representação molecular de GI-16 e SC-15.....	31
Figura 5	Avaliação de edema de pata após estímulo inflamatório com carragenina.....	36
Figura 6	Avaliação da inflamação pulmonar após estímulo com LPS.....	38
Figura 7	Teste de toxicidade aguda e sub-crônica.....	42
Figura 8	Avaliação do edema de pata induzido por carragenina.....	45
Figura 9	Níveis de TNF- $\alpha$ (A), IL-6(B) e IL-10(C) obtidos do homogenato pulmonar de camundongos C57Bl/6.....	47
Figura 10	Microscopia ótica de corte de tecido pulmonar de camundongos C57Bl/6.....	50
Figura 11	Teste de toxicidade aguda. Avaliação do consumo alimentar e hídrico dos ratos Wistar fêmeas (A e C) e machos (B e D).....	52
Figura 12	Teste de toxicidade aguda. Avaliação do ganho de peso dos ratos Wistar fêmeas (A) e machos (B).....	53
Figura 13	Teste de toxicidade aguda. Níveis sorológicos de alanina aminotransferase (ALT) (A), aspartato aminotransferase (AST) (B) e fosfatase alcalina (C).....	54
Figura 14	Teste de toxicidade aguda. Níveis sorológicos de triglicérides (A), colesterol total (B) e glicose (C).....	55

Figura 15	Teste de toxicidade aguda. Nível sorológico de creatinina.....	56
Figura 16	Teste de toxicidade aguda. Número de hemácias (milhões/ml) (A), hematócrito (%) (B) e nível de hemoglobina em mg/dl (C).....	57
Figura 17	Teste de toxicidade aguda. Número de leucócitos granulares (%) (A), monócitos (%) (B), segmentados (%) (C), linfócitos/ml (D), eosinófilos/ml (E) e plaquetas/ml (F).....	58
Figura 18	Teste de toxicidade sub-crônica. Avaliação do consumo alimentar e hídrico dos ratos Wistar fêmeas (A e C) e machos (B e D).....	61
Figura 19	Teste de toxicidade sub-crônica. Avaliação do ganho de peso dos ratos Wistar fêmeas (A) e machos (B).....	61
Figura 20	Teste de toxicidade sub-crônica. Níveis sorológicos de alanina aminotransferase (ALT) (A), aspartato aminotransferase (AST) (B) e fosfatase alcalina (C).....	62
Figura 21	Teste de toxicidade sub-crônica. Níveis sorológicos de triglicérides (A), colesterol total (B) e glicose (C).....	63
Figura 22	Teste de toxicidade sub-crônica. Nível sorológico de creatinina.....	64
Figura 23	Teste de toxicidade sub-crônica. Nível sorológico de creatinina.....	65
Figura 24	Teste de toxicidade sub-crônica. Número de leucócitos granulares (%) (A), monócitos (%) (B), segmentados (%) (C), linfócitos/ml (D), eosinófilos/ml (E) e plaquetas/ml (F).....	66
Figura 25	Teste de toxicidade aguda. Microscopia ótica de corte de tecido cardíaco.....	68
Figura 26	Teste de toxicidade sub-crônica. Microscopia ótica de corte de tecido cardíaco.....	69

Figura 27	Teste de toxicidade aguda. Microscopia ótica de corte de tecido hepático (veia centrolobular).....	71
Figura 28	Teste de toxicidade sub-crônica. Microscopia ótica de corte de tecido hepático (veia centrolobular).....	72
Figura 29	Teste de toxicidade aguda. Microscopia ótica de corte de tecido hepático (espaço-porta).....	73
Figura 30	Teste de toxicidade sub-crônica. Microscopia ótica de corte de tecido hepático (espaço-porta).....	74
Figura 31	Teste de toxicidade aguda. Microscopia ótica de corte de tecido renal (medula).....	76
Figura 32	Teste de toxicidade sub-crônica .Microscopia ótica de corte de tecido renal (medula).....	77
Figura 33	Teste de toxicidade aguda. Microscopia ótica de corte de tecido renal (córtex).....	78
Figura 34	Teste de toxicidade sub-crônica. Microscopia ótica de corte de tecido renal (córtex).....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Disposição dos grupos para o experimento de avaliação de edema de pata após estímulo com carragenina.....	32
Tabela 2	Disposição dos grupos para o experimento de avaliação da inflamação de pulmão após estímulo com LPS.....	33
Tabela 3	Disposição dos grupos para o experimento referente ao teste de toxicidade aguda.....	34
Tabela 4	Disposição dos grupos para o experimento referente ao teste de toxicidade sub-crônica.....	35
Tabela 5	Escore de inflamação nos pulmões de camundongos estimulados com LPS (200µg/ml) e submetidos ao tratamento com talidomida, análogos ou dexametasona na concentração de 20mg/kg.....	49
Tabela 6	Escore de inflamação nos pulmões de camundongos estimulados com LPS (200µg/ml) e submetidos ao tratamento com talidomida, análogos ou dexametasona na concentração de 50mg/kg.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	“Acquired immunodeficiency syndrome”. Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Alanina aminotransferase.
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária.
AST	Aspartatoaminotransferase.
bFGF	“Basic fibroblastic growth factor” Fator de crescimento fibroblástico
COX	Cicloxigenases.
DMSO	Dimetil-sulfóxido.
DNA:	“Desoxirribonucleic acid” Ácido desoxirribonucleico
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay” Ensaio imunoenzimático ligado à imunoabsorbância .
ENL	Eritema nodoso leproso.
FDA	“ Food anddrug administration”. Administração de alimentos e drogas
FAL	Fosfatase alcalina.
FUNED	Fundação Ezequiel Dias.
htert	“Human telomerase” Telomerase humana
IFN	Interferon.
IL	Interleucina.
LG	Leucócitos granulares.
Hb	Hemoglobina.
LPS	Lipopolissacarideo.
MAPK	“Mitogen activated proteinkinase” Proteína quinase ativada por mitógeno

MM	Mieloma múltiplo.
NEMO	“NF-κB essential modifier” Modificador essencial de NF-κB
NF-κB	“Nuclear factor kappa B” Fator nuclear kappa B
NK	“Natural killer cell” Célula citotóxica natural
PBMC	“Peripheral blood mononuclear cells” Células mononucleares de sangue periférico .
PBS	“Phosphatebufferedsaline” Solução salina tamponada com fosfato
PG	Prostaglandina.
PHA	“ Phytohaemagglutinin” fitohemaglutinina
RNA	“Ribonucleic acid” Ácido ribonucléico.
TPA	“Tetradecanoyl phorbolacetate” Tetradecanoil forbol acetato.
TNF	“Tumoral necrosis factor” Fator de necrose tumoral.
VEGF:	“Vascular endothelial growth factor” Fator de crescimento endotelial vascular.



## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1	Histórico da talidomida.....	18
1.2	Propriedades químicas e farmacológicas da talidomida.....	20
1.3	Influência da talidomida na produção de citocinas e moléculas de adesão.....	22
1.4	Influência da talidomida sobre angiogênese.....	24
1.5	Mecanismos moleculares de modulação exercida pela talidomida sobre o sistema imune.....	25
1.6	O desenvolvimento de análogos de análogos de talidomida.....	27
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
2.1	Gerais.....	30
2.2	Específicos.....	30
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1	Talidomida e os análogos SC-15 e GI16.....	30
3.2	Animais e grupos experimentais .....	31
3.3	Avaliação do edema de pata após estímulo inflamatório com carragenina .....	35
3.4	Avaliação da inflamação pulmonar após estímulo com LPS.....	36
3.4.1	Obtenção do homogenato pulmonar.....	38
3.4.2	Efeito modulatório dos análogos SC-15 e GI-16 sobre a produção de citocinas.....	39
3.4.3	Análise histopatológica do pulmão direito após estímulo inflamatório com LPS.....	39
3.5	Teste de toxicidade aguda .....	40
3.6	Teste de toxicidade sub-crônica.....	41
3.6.1	Análise histopatológica do coração, fígado e rins.....	42
4	<b>RESULTADOS</b> .....	44
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	80
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	91
7	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	92
8	<b>ANEXOS</b> .....	106

## 1.-INTRODUÇÃO

### 1.1 -Histórico da talidomida

A talidomida (Figura1) foi sintetizada pela empresa farmacêutica CIBA, na Suíça no ano de 1953. Entretanto, a aparente ausência de efeitos farmacológicos fez com que a empresa suspendesse as pesquisas em cima deste fármaco. Em 1954, os químicos Wilhelm Kunz e Herbert Keller, da companhia farmacêutica da República Federal da Alemanha (Occidental), “Chemie Grünenthal”, mantiveram as pesquisas e o desenvolvimento da talidomida (RANDALL, 1990). Dois anos mais tarde, Kunz e colaboradores (1956) publicaram o primeiro artigo descrevendo os efeitos farmacológicos da talidomida, disponibilizando-a para o mercado sob o nome de *Contergan* sendo amplamente comercializada como fármaco não-tóxico, sedativo-hipnótico, no tratamento da insônia, ansiedade, enjôos e indisposições matinais, principalmente em mulheres grávidas. O mesmo estudo relatou que administrações de 100-500mg/kg deste fármaco a camundongos, cobaias e coelhos por 30 dias, apresentaram boa tolerância. Esses achados levaram os pesquisadores da “Chemie Grunenthal” a proporem que a talidomida seria um sedativo-hipnótico benéfico, sem apresentar risco de morte por suicídio, ao contrário de alguns medicamentos da época, além de exibir um efeito sedativo mais duradouro e menos letal nos grupos animais testados (RAJE e ANDERSON, 1999; BOTTING, 2001).

A aparente ausência de efeitos colaterais fez com que a talidomida fosse amplamente comercializada na Alemanha e em mais de 46 países, incluindo os da Europa e América do Sul, além do Canadá e outras regiões do mundo, sendo fornecida, inclusive, sem necessidade de prescrição médica (KELSEY, 1988). Entretanto, em 1958, seu uso começou a ser cada vez mais associado a quadros de neuropatias periféricas e focomelia (desenvolvimento irregular de braços e/ou de pernas), malformações intestinais, defeitos de ossos longos e outros distúrbios em filhos de mulheres grávidas usuárias deste composto (BORGES e FRÖHLICH, 2003; MELCHERT e LIST, 2007). Assim, após três anos de comercialização e intensa pressão da imprensa, a talidomida foi

abolida, deixando um trágico saldo de oito mil crianças com malformação congênita em 46 países, inclusive no Brasil (BORGES e FRÖEHLICH, 2003).

Em 1965, foi reportado pela primeira vez pelo médico dermatologista Jacob Sheskin os efeitos clínicos da talidomida em pacientes com eritema nodoso leproso (ENL), uma complicação imuno-inflamatória que afeta pacientes com Hanseníase (BOCHUD, *et al.*, 2008). Segundo revisão de Lima, Fraga e Barreiro (2001), o mesmo médico observou que o tratamento com talidomida resultou em redução da dor e dos processos inflamatórios associados ao ENL, identificando as propriedades antiinflamatórias deste fármaco. Desta forma, a talidomida ressurgiu no tratamento de pacientes com Hanseníase, estimulando novas pesquisas sobre seus efeitos no eritema nodoso leproso (ENL) e em outras enfermidades relacionadas a processos inflamatórios crônicos (LIMA, FRAGA e BARREIRO, 2001).

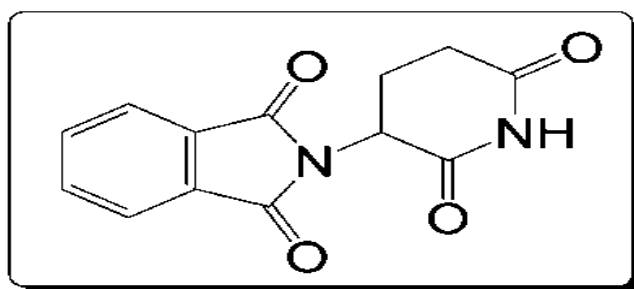


Figura 1. Estrutura molecular da talidomida (adaptado de FRANKS *et al.*, 2004).

Atualmente, a talidomida é um importante fármaco com ampla aplicabilidade no tratamento de diversas desordens imunológicas, incluindo eritema nodoso leproso, lupus eritematoso, doença de Cronh, artrite reumatóide. Além disso, esta droga é utilizada em infecções patogênicas, tratamento de enfermidades relacionadas à síndrome da imunodeficiência adquirida e variados tipos de neoplasias dependentes de angiogênese, como mieloma múltiplo, tumores sólidos, síndrome mielodisplásica, melanoma, câncer de próstata e outras doenças (MELCHERT e LIST, 2007; ITO *et al.*, 2010).

## 1.2- Propriedades químicas e farmacológicas da talidomida

A talidomida contém um grupo glutarimídico com centro quiral único na posição 3 e um grupamento ftalimida (Figura 2a) além de consistir numa mistura racêmica com dois enantiômeros ativos, S(-) e R(+) (2b). S(-) é responsável pelos efeitos teratogênicos e R(+) pelos efeitos sedativos. Com isso, procedimentos executados para a purificação da isoforma R(+), visando-se aperfeiçoar sua aplicação clínica, resultaram numa rápida interconversão dos isômeros em condições fisiológicas. Desta maneira, a aplicação do enantiômero puro resulta em alterações do desenvolvimento embrionário. Estudos adicionais também demonstraram que ambas as formas foram teratogênicas em coelhos da linhagem Nova Zelândia Branco, que são susceptíveis aos efeitos teratogênicos da talidomida. Logo, foi evidenciado que a relação entre a estereoespecificidade e o efeito teratogênico é dependente do modelo animal (FABRO, SMITH e WILLIAMS, 1967; ERIKSSON, BJORKMAN e HOGLUND, 2000).

Por outro lado, Teo e colaboradores (2004), descrevem que o enantiômero (S-) é responsável pela atividade anti-fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) enquanto que o (R+) é responsável pelo efeito sedativo mediado por receptores de sono. Conforme enunciado por Wnendt e Zwingenberger (1997), a falta de separação entre estereoespecificidade em relação à teratogenicidade e também a rápida racemização da talidomida contradizem a hipótese de que o uso do enantiômero puro preveniria o efeito trágico da talidomida.

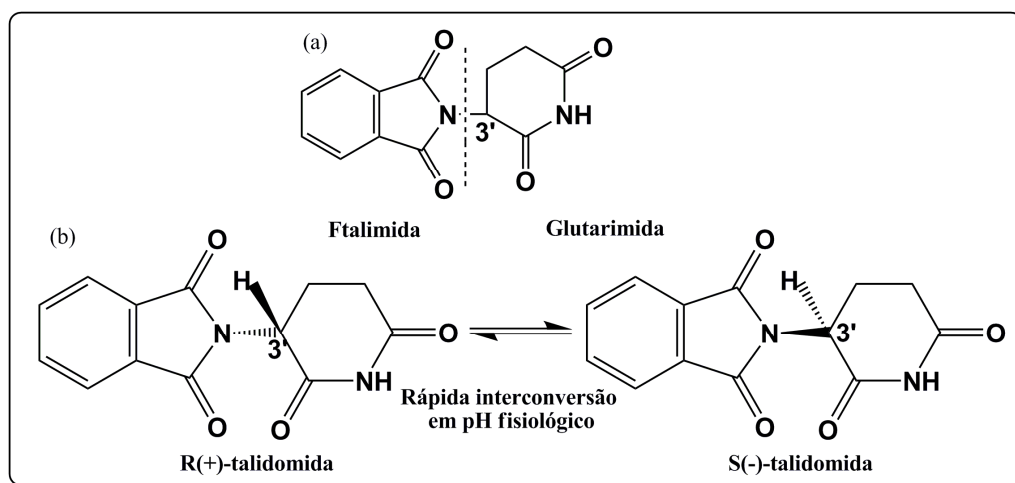


Figura 2. Representação estrutural dos grupamentos da talidomida (a) e dos seus enantiômeros (b) (adaptado de FRANKS, MACPHERSON e FIGG, 2004).

A baixa solubilidade em água apresentada pela talidomida reflete no seu pico de concentração plasmática, sendo detectável entre 3 a 6 horas dependendo da dose. Uma vez ingerida, a talidomida é clivada por hidrólise não-enzimática em mais de 12 a 20 diferentes tipos de metabólitos, sendo pouco metabolizada no fígado (SCHUMACHER *et al.*, 1965). Segundo a revisão de Lima, Fraga e Barreiro (2001), mais de 90% do fármaco absorvido é eliminado através das fezes e urina com 48 horas e estudos sobre o destino metabólico da talidomida, evidenciaram que a droga apresenta instabilidade em solução aquosa, onde em pH ácido (pH=6,0) observou-se hidrólise espontânea do anel glutarimídico (Figura 3a e 3b). Contudo, em pH fisiológico (7,4) (Figura 3c e 3d) a talidomida sofre metabolismo de 28% na primeira hora de ensaio, sendo os metabólitos identificados como produtos de hidrólise do anel ftalimídico e glutarimídico. Por outro lado, em pH=8,0 sua taxa de metabolização é consideravelmente aumentada (66% na primeira hora) evidenciando que o metabolismo *in vivo* da talidomida é estritamente relacionado ao pH do sistema.

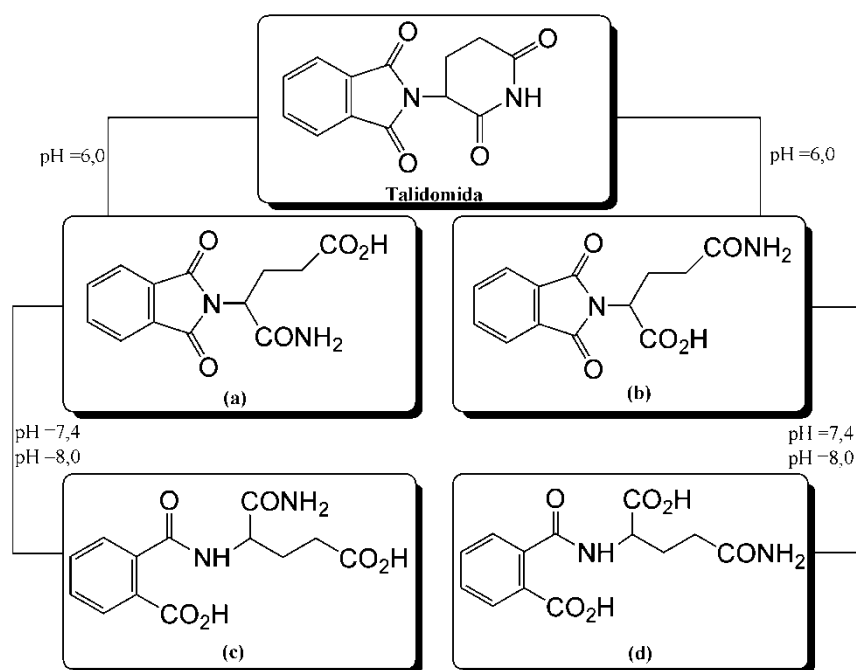


Figura 3. Principais metabólitos *in vivo* da talidomida (adaptado de LIMA, FRAGA e BARREIRO, 2001).

### 1.3-Influência da talidomida na produção de citocinas e moléculas de adesão

Um mecanismo importante da imunidade inata é a produção de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ . Estas moléculas apesar de serem de suma importância na ativação do sistema imune e conseqüente combate a substâncias e microorganismos invasores, também podem apresentar importante papel na patogenia de diversas desordens imunológicas (SAMPAIO *et al.*, 1991). A talidomida têm recebido destaque quanto a sua atividade inibitória sobre a produção dessas citocinas. O TNF- $\alpha$  e a IL-1 atuam como mediadoras da resposta imune inata e de fase aguda. Essas citocinas possuem múltiplos efeitos, incluindo ativação de células e proteínas inflamatórias, aumento do fluxo sanguíneo nas áreas inflamadas, citotoxicidade e febre, contribuindo para diversas enfermidades envolvendo inflamação crônica ou exacerbada (ROCHA *et al.*, 2006). Em modelo de injúria por queimadura em roedores (ESKI *et al.*, 2008) e pancreatite induzida por ceruleína (decapeptídeo isolado da pele de anfíbio usado para estimular secreções gástrica, biliar e

pancreática) (MALLEO, *et al.* 2008), a talidomida reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no plasma, respectivamente. Demonstrou-se também que pacientes com Hanseníase, apresentavam níveis elevados de TNF- $\alpha$  e que a talidomida apresenta a capacidade de reduzir a produção desta citocina em monócitos, contribuindo para o controle das manifestações clínicas (BASÍLIO *et al.*, 2012). Além disso, pacientes com tuberculose e AIDS, tratados com talidomida, também apresentaram queda de TNF- $\alpha$  caracterizada pela melhora clínica do granuloma e redução da carga viral (KLAUSNER *et al.*, 1996). Desta forma, TNF- $\alpha$  e IL-1 atuam como potenciais alvos da talidomida.

A IL-6 é uma importante citocina envolvida com atividade hematopoiética, contribuindo para interação e proliferação de células da medula óssea. Além disso, atua estimulando a produção dos anticorpos IgM, IgG e IgA (KISHIMOTO, 1989) e liberação das proteínas hepáticas de fase aguda (HEINRICH *et al.*, 1990). A produção de IL-6 é marcadamente expressa no mieloma múltiplo, permitindo a adesão de células tumorais ao estroma da medula óssea, levando ao crescimento e sobrevivência destas células (CALIGARIS-CAPPIO *et al.*, 1991; GUPTA *et al.*, 2001). Além disso, altos níveis de IL-6 podem estar associados aos distúrbios associados ao perfil Th17, contribuindo para a gravidade destes quadros (BETELLI *et al.*, 2006). Estudos com camundongos infectados com a linhagem Erdman de *Mycobacterium tuberculosis* e pesquisas *in vitro* com PBMC humanas estimuladas com o mitógeno de fitohemaglutinina (PHA), demonstram que o tratamento com talidomida ocasiona redução dos níveis séricos e de mRNA de IL-6. Os pacientes tratados apresentaram melhora clínica, reforçando o caráter inibitório deste composto sobre a produção de IL-6 (CALIGARIS-CAPPIO *et al.*, 1991).

Moller e colaboradores (1997) relataram os efeitos inibitórios da talidomida sobre IL-12 produzida por células mononucleares sanguíneas, mediante desafio com LPS ou *Staphylococcus aureus* Cowan. Esta citocina é importante no desenvolvimento das respostas envolvendo liberação de IFN- $\gamma$  e aumento nas respostas citotóxicas por linfócitos TCD8+ e células NK no combate a células cancerosas ou infectadas por vírus (TRINCHIERI, 1995). Utilizando ratos Wistar tratados com ácido sulfônico 2,4,6 trinitribenzeno, usado para indução de colites de Crohn's, observou-se redução dos níveis de

IL-12 em culturas de células de amostras do cólon no grupo tratadas com talidomida (CARVALHO *et al.*, 2007). O mesmo efeito inibitório foi observado em PBMC e em células da lâmina própria obtidas através de biópsias de pacientes com doença de Cronh's (BAUDITZ *et al.*, 2002).

Estudos *in vitro* demonstraram que a talidomida exerce capacidade inibitória sobre L-selectina e E-selectina, as quais são responsáveis pelo rolamento leucocitário, o qual ocorre em ocasiões de inflamação. Além disso, a talidomida é capaz de reduzir a migração e quimiotaxia leucocitária induzidos por diversas quimiocinas, dentre elas a CXCL8, também conhecida como IL-8. Esta quimiocina é liberada por macrófagos teciduais e queratinócitos em resposta a presença de patógenos (PARAVAR e LEE, 2008). Estudos adicionais também mostram que a talidomida diminui a migração de células T para zonas de infecção por inibir CCL2, CCL5 e CXCL10 (AGOSTINI *et al.*, 2002; PETREK *et al.*, 2002;). A migração e acúmulo de linfócitos T (LT) do perfil T helper1 (Th1), expressando CXCR3 para quimiocinas deste perfil, são favorecidos pela produção da quimiocina CXCL10 por macrófagos e liberação de outras citocinas induzidas pelo IFN- $\gamma$ , como o CXCL9 (AGOSTINI *et al.*, 2002). Este acúmulo de linfócitos T contribui para enfermidades como o lupus eritematoso, conforme descrito em trabalhos de Wenzel e colaboradores (2007), onde biópsia de pacientes com diferentes subtipos de lupus eritematoso revelou uma associação morfológica entre acúmulo de células Th1 CXCR3+ e presença de quimiocinas induzidas por IFN- $\gamma$ . Além disto, o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  atuam em sinergismo para produção de CCL5 por células endoteliais (MARFAING-KOKA *et al.*, 1995), atuando como fator quimiotático para células T de memória, monócitos/macrófagos, basófilos e eosinófilos (SCHALL *et al.*, 1990; BEN-BARUCH, MICHIEL e OPPENHEIM, 1995).

#### **1.4- Influência da talidomida sobre a angiogênese**

A angiogênese é o fenômeno de geração de vasos sanguíneos, responsável pela nutrição e reparação tecidual. Os processos angiogênicos são de extrema importância no desenvolvimento de tumores e metástases. Tem sido relatado que a talidomida exerce capacidade em reduzir a formação



de vasos sanguíneos sendo, portanto, uma das ferramentas no combate ao câncer e outras patologias dependentes de grande vascularização (BAUER, DIXON e FIGG, 1998).

Conforme dito anteriormente, a talidomida é capaz de induzir uma enorme variedade de malformações fetais e, segundo D'Amato e colaboradores (1994), um dos principais mecanismos desempenhados por esta droga e que contribui para este quadro está na sua capacidade em interferir na formação de vasos sanguíneos. Utilizando-se de um modelo de córnea de coelhos, cuja formação de vasos sanguíneos é influenciada pelo fator de crescimento de fibroblástico básico (bFGF), verificou-se que a talidomida é capaz de inibir esta proteína reduzindo a vascularização tecidual. Essa descoberta levou a novas especulações a respeito do papel da talidomida em patologias envolvendo a dependência de formação de novos vasos para o tratamento de doenças malignas. O primeiro tipo de tumor no qual a talidomida foi utilizada consistiu no tratamento do mieloma múltiplo (MM) refratário, onde uma proeminente vascularização ocorre na medula óssea de pacientes com essa enfermidade (D'AMATO *et al.*, 1991).

Estudos posteriores demonstraram mecanismos adicionais dos quais a talidomida faz uso para controlar a irrigação sanguínea tecidual. Hoje se sabe que a inibição de TNF- $\alpha$ , diminuição do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), redução de produção da integrina  $\alpha V\beta 3$ , e diminuição de moléculas de adesão em células endoteliais estão entre as principais estratégias usadas no combate a neoplasias (KEIFER *et al.*, 2001).

### **1.5-Mecanismos moleculares de modulação exercida pela talidomida sobre o sistema imune**

A talidomida é capaz de interferir nas mais variadas etapas da produção e liberação das citocinas. O fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), é uma das moléculas chaves nas mais variadas funções imunológicas como a transcrição de quimiocinas, ligantes de superfície como os ligantes B7 e moléculas de adesão à superfície, além de desencadear a liberação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-

6, IL-12 e COX-2, fatores angiogênicos entre outros (LOKENSARD, *et al.*, 2000; KEIFER *et al.*, 2001).

Foi demonstrado em trabalhos feitos com células T jukart estimuladas com TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que a inibição provocada pela talidomida sobre NF- $\kappa$ B, se deve através da supressão sobre a proteína NEMO (modificador essencial de NF- $\kappa$ B), que é responsável por fosforilar o inibidor de NF- $\kappa$ B. Uma vez que tal inibidor esteja fosforilado, NF- $\kappa$ B transloca-se até o núcleo celular para poder desempenhar suas funções (LOKENSARD, *et al.*, 2000; KEIFER *et al.*, 2001). Entretanto, Majumdar e colaboradores (2002), relatam que esta droga não interfere sobre NF- $\kappa$ B quando as células T jukart são estimuladas por LPS, ceramídeos ou forbol éster. Desta maneira, sugeriu-se que a habilidade da talidomida em modular a expressão gênica via ativação de NF- $\kappa$ B depende do mecanismo de sinalização ativado por receptores e vias específicos (SAMPAIO *et al.*, 2006).

A talidomida também é capaz de interagir com os ácidos nucléicos (DNA e RNA) interferindo na expressão gênica das mais variadas citocinas e moléculas mediadoras de inflamação. Foi proposto que um mecanismo pelo qual a talidomida inibe a produção de TNF- $\alpha$  é acelerando a degradação de seu mRNA. Estudos realizados em PBMC humano estimuladas com LPS, mostram que o tratamento com talidomida ocasiona redução da meia vida do mRNA de TNF- $\alpha$  de 30 minutos para 17 minutos (MOREIRA *et al.*, 2000; MAZZOCOLI *et al.*, 2012). Outros estudos também demonstram a influência desta droga sobre o mRNA de outras substâncias como as envolvidas com angiogênese (MOREIRA *et al.*, 2000).

Alterações do fluxo sanguíneo e de permeabilidade vascular são eventos caracterizados pela ação de prostaglandinas (PGEs), como a PGE<sub>2</sub>, cuja liberação ocasiona febre, dor e inflamação sistêmica. Estudos feitos por Noguchi e colaboradores (2002) mostram que a talidomida é capaz de inibir a expressão das cicloxigenases COX-1 e COX-2, responsáveis pela liberação de prostaglandinas, através de desestabilização de seu mRNA mediante inibição do deslocamento citoplasmático de antígeno humano R, que é um estabilizador de proteínas, e inibição da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) p38,

que está envolvida na regulação pós-transcricional da estabilidade do mRNA COX-2 (JIN *et al.*, 2007). Uma vez que COX-2 é altamente expressa em vários tipos de câncer, a antiangiogênese exercida pela talidomida pode contribuir para o tratamento desta doença.

Em função de sua capacidade de se ligar ao DNA, a talidomida é capaz de interferir na produção de citocinas devido a sua similaridade com as bases de adenina e guanina deste ácido nucléico. Desta forma, ligando-se a este material genético celular, este fármaco é capaz de “desligar” os genes envolvidos com inflamação através da capacidade de se intercalar a regiões promotoras, bloqueando o acesso de proteínas envolvidas com a transcrição dessa região (SCHUMACHER *et al.*, 1968; SAMPAIO *et al.*, 2006). Drucker e colaboradores (2003) demonstraram, através do uso de células de mieloma, a inibição transcricional de genes com regiões promotoras ricas em guanina e citosina de proteínas como a transcriptase reversa da telomerase humana (htert). O estudo demonstrou que a talidomida intercalou-se na região promotora do gene de htert, que serve de região de ligação para o fator SP-1 envolvido na transcrição. htert é um gene importante no tratamento do câncer pois células tumorais o expressam em grande quantidade e ao reduzir sua expressão, ocorre maior combate às células tumorais de uma maneira mais seletiva (DRUCKER *et al.*, 2003).

### **1.6-O desenvolvimento de análogos da talidomida**

O sucesso da talidomida no controle dos mais variados quadros inflamatórios, estimulou cada vez mais os estudos sobre a mesma. (SAMPALIO *et al.*, 1992; SAMPAIO *et al.*, 1993). Visando aprimorar as propriedades farmacocinéticas desta substância e contornar seus efeitos adversos, diversos estudos têm sido desenvolvidos na busca de análogos visando manter ou elevar as propriedades benéficas da talidomida. (MARRIOT *et al.*, 1998; CORRAL *et al.*, 1999)

Os primeiros estudos com análogos da talidomida buscaram a relação entre a estrutura química e atividade, cujo objetivo era identificar os possíveis grupos com atividade farmacológica. Com isso, foram realizadas modificações

estruturais nos grupos glutarimídicos e ftalimídicos da talidomida (LIMA, FRAGA e BARREIRO 2001). Estudo feito por Miyachi e colaboradores (1997) demonstrou que algumas modificações na subunidade ftalimídica acarretavam em alterações da atividade desta droga em controlar TNF- $\alpha$ , sendo reforçada por Muller e colaboradores (1999). Desta forma, sugere-se que a estrutura ftalimídica apresenta importante papel no controle de TNF- $\alpha$  (LIMA, FRAGA e BARREIRO, 2001).

Em trabalhos com outros análogos da talidomida, Muller e colaboradores (1996) perceberam que compostos apresentando grupo ftalimídico intacto e com grupo glutarimídico hidrolisado apresentaram ação melhor que a própria talidomida na inibição da produção de TNF- $\alpha$  em culturas de PBMC humanos. Corral e colaboradores (1996) também mostraram que análogos com grupo ftalimido intacto e substituindo-se o anel glutarimídico por grupo fenil contendo radicais metoxi apresentavam elevação significativa da atividade inibitória sobre a produção de TNF- $\alpha$  em PBMC humano. Além disso, esse mesmo estudo demonstrou que compostos com grupo amino na posição 4 da estrutura ftalimídica demonstraram-se ser mais potentes que a talidomida no controle de quadros inflamatórios desempenhados por PBMC humanas.

Nakamura e colaboradores (2006) demonstraram que o acréscimo do radical hidroxila (OH), na posição 5 do grupo ftalimídico e glutarimídico da talidomida, acarretava em queda dos níveis de TNF- $\alpha$  em monócitos humanos THP1. Em seguida, este mesmo grupo analisou compostos compreendendo produtos metabolizados da talidomida em modelos com células humanas THP-1 estimuladas com TPA (tetradecanoilforbol acetato), onde viram que análogos contendo grupo ftalimido aberto, ou o grupo glutarimídico aberto, ou ambos grupos abertos, podem aumentar a atividade inibitória sobre TNF- $\alpha$  e outras citocinas. Corral e colaboradores (1999) constataram que análogos ftalimídicos abertos não apenas causaram diminuição da produção de TNF- $\alpha$ , mas também de IL-12 e IL-1 $\beta$  em monócitos estimulados por LPS.

Almeida e colaboradores (2007) analisaram diversos análogos biftalimídicos hidrolisados separados por diaminas e poliaminas entre as duas subunidades ftalimídicas. Em seus estudos, esses autores mostraram o

potencial efeito dos análogos da talidomida em inibir significativamente a produção de TNF- $\alpha$ , sendo mais eficientes que a droga que lhes serviu de base. Dando continuidade a essa linha de pesquisa, Mazzoccoli e colaboradores (2012) analisaram novos análogos da talidomida que continham estrutura ftalimídica aberta e diaminas com ou sem grupamento NO<sub>2</sub>, que apresentam forte capacidade de inibição de importantes substâncias pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , óxido nítrico (NO), IL-6, CXCL9 e CXCL10 em células J774. Além disso, induziram a produção de IL-10, importante citocina envolvida com imunossupressão, utilizada por células T regulatórias para controlar as reações inflamatórias, conduzindo o sistema imunológico ao estado basal e evitando autoimunidades (MOREIRA *et al.*, 1997; MOHEBBATIKALJAH *et al.*, 2009)

Compostos poliamínicos e diamínicos como a putrescina (1,4-diaminobutano) apresentam um papel chave em vários processos biológicos, apresentando diversas propriedades farmacológicas (PEGG, 1988; EDWARDS, 1990). Diversos trabalhos analisaram certos análogos de talidomida que se caracterizam por possuir grupo ftalimídico hidrolizado na ligação entre o carbono na posição 3 e com o hidrogênio com ou sem presença do grupamento NO<sub>2</sub>. Cada composto apresenta duas subunidades ftalimídicas e foram preparadas pela condensação das diaminas, exibindo alta atividade de contenção sobre TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-6, além de outras moléculas relacionadas à inflamação (MULLER *et al.*, 1996; MULLER *et al.*, 1999).

Desta maneira, em virtude das limitações do uso da talidomida para fins terapêuticos e do sucesso dos análogos ftalimídicos diamínicos que possuem ou não grupamento NO<sub>2</sub>, em controlar diversos mediadores inflamatórios *in vivo*, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos *in vivo* de novos compostos derivados da talidomida, que se caracterizam pelas suas subunidades ftalimídicas abertas com presença de diaminas, como tentativa de obtenção de novos fármacos mais eficazes, menos nocivos e mais tolerantes por seus usuários.

## **2- OBJETIVOS**

### **- Objetivo geral**

Avaliar a atividade antiinflamatória *in vivo* e a toxicidade aguda e sub-crônica dos compostos SC-15 e GI-16.

### **- Objetivos específicos**

Avaliar *in vivo* a capacidade dos compostos SC-15 e GI-16 em controlar o edema de pata induzido por inoculação subcutânea com carragenina a 2%,

Avaliar *in vivo* a capacidade dos compostos SC-15 e GI-16 em modular a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 obtidas do homogenato dos pulmões de camundongos, após a indução de inflamação mediante inoculação intratraqueal com LPS.

Realizar análise histopatológica dos pulmões de camundongos tratados com os compostos SC-15 e GI-16 e estimulados com LPS.

Avaliar a toxicidade pré-clínica (toxicidade aguda e sub-crônica) dos compostos SC-15 e GI-16 e seus efeitos *in vivo* sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos além de possíveis alterações fisiológicas e comportamentais em decorrência do tratamento com estes fármacos.

## **3.- MATERIAIS E MÉTODOS**

Todas as etapas deste trabalho e animais utilizados foram realizados com a devida autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Juiz de Fora, protocolo N°0162010.

### **3.1-Talidomida e os compostos SC-15 e GI-16**

A talidomida foi obtida junto à Fundação Ezequiel Dias (FUNED) (Belo Horizonte) em comprimidos de 100 mg. Os compostos SC-15 e GI-16 foram obtidos do Laboratório de Química do Dr.Mauro V. Almeida no Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora. O composto SC-15

possui 3 carbonos separando suas unidades ftalimídicas e não possui grupamento NO<sub>2</sub>. GI-16, por sua vez, possui dois carbonos separando suas unidades ftalimídicas e um grupamento NO<sub>2</sub> (Figura 4) Estes compostos são protegidos pela patente/INPI número 020090036089.

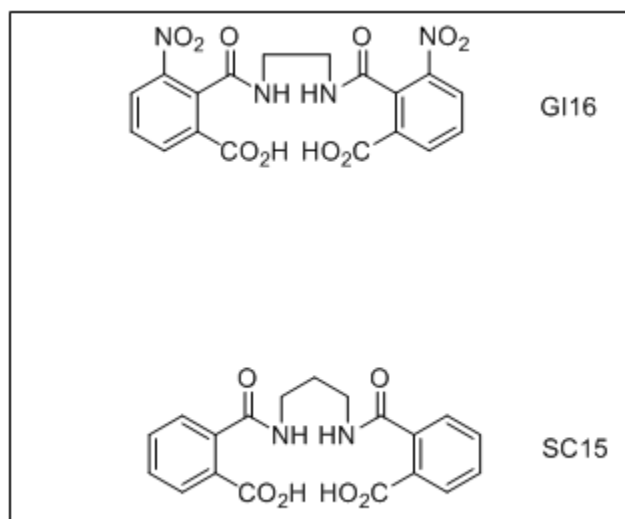


Figura 4. Representação da estrutura molecular dos análogos da talidomida GI-16 e SC-15. Estas drogas caracterizam-se por suas duas subunidades ftalimídicas abertas e hidrolisadas onde GI-16 possui o grupamento NO<sub>2</sub>.

Os compostos foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%) para aplicação nas concentrações adequadas a cada tipo de experimento. A talidomida foi solubilizada em DMSO 100% seguido de posterior diluição em solução salina, correspondendo à concentração final utilizada para cada teste deste trabalho.

### 3.2- Animais e Grupos Experimentais

#### 3.2.1- Avaliação de edema de pata após estímulo inflamatório com carragenina

Foram utilizados 40 Camundongos BALB/c, machos com cerca de 7 semanas de vida e peso médio de 25 gramas, obtidos junto ao Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os mesmos foram divididos em 8 grupos e dispostos conforme tabela abaixo:

**Tabela 1**-Disposição dos grupos para o experimento de avaliação de edema de pata após estímulo com carragenina.

<b>Grupos</b>	<b>n</b>
Controle salina	5
Talidomida (10mg/kg)	5
Talidomida (50mg/kg)	5
SC-15 (10mg/kg)	5
SC-15 (50mg/kg)	5
GI-16 (10mg/kg)	5
GI-16 (50mg/kg)	5
Dexametasona	5

n=número de camundongos por grupo

### **3.2.2- Avaliação da inflamação pulmonar após estímulo com LPS.**

Foram utilizados 50 camundongos C57Bl/6 fêmeas com 6 a 8 semanas de idade e peso médio de 19 gramas, originários do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte). Os animais foram distribuídos em 9 grupos constituídos e dispostos conforme tabela abaixo:



**Tabela 2-** Disposição dos grupos para o experimento de avaliação da inflamação pulmonar após estímulo com LPS.

<b>Grupos</b>	<b>n</b>
Controle salina	10
Talidomida (20mg/kg)	5
Talidomida (50mg/kg)	5
SC-15 (20mg/kg)	5
SC-15 (50mg/kg)	5
GI-16 (20mg/Kg)	5
GI-16 (50mg/Kg)	5
Dexametasona (20mg/kg)	5
Dexametasona (50mg/kg)	5

n=número de camundongos por grupo.

### **3.2.3- Teste de toxicidade aguda**

Foram utilizados 40 ratos Wistar (20 machos e 20 fêmeas) com peso de 200-350 gramas oriundos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte). Os animais foram divididos em 8 grupos constituídos e dispostos conforme tabela abaixo:

**Tabela 3-** Disposição dos grupos para o experimento referente ao teste de toxicidade aguda

<b>Grupos</b>	<b>n</b>
Salina macho	5
Salina fêmea	5
Talidomida macho	5
Talidomida fêmea	5
SC-15 macho	5
SC-15 fêmea	5
GI-16 macho	5
GI-16 fêmea	5

n=número de ratos por grupo

### **3.2.3- Teste de toxicidade sub-crônica**

Foram utilizados 50 ratos Wistar, (25 machos e 25 fêmeas) com peso de 200-350 gramas oriundos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte). Os animais foram divididos em 10 grupos constituídos e dispostos conforme tabela abaixo:

**Tabela 4-** Disposição dos grupos para o experimento referente ao teste de toxicidade sub-crônica.

<b>Grupos</b>	<b>n</b>
Salina macho	3
Salina fêmea	3
DMSO/Salina macho	4
DMSO/Salina fêmea	4
Talidomida macho	6
Talidomida fêmea	6
SC-15 macho	6
SC-15 fêmea	6
GI-16 macho	6
GI-16 fêmea	6

n=número de ratos por grupo

### **3.3- Avaliação do edema de pata após estímulo inflamatório com carragenina**

Para este experimento, a talidomida foi diluída inicialmente em DMSO 100% e logo após foi solubilizada em solução salina (NaCl 0,9%) resultando numa solução de droga com 3,96% de DMSO.

Os camundongos foram mantidos em gaiolas apropriadas com água e ração *ad libitum* à 25°C, no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia-UFJF. Os animais foram pesados para obtenção de seu peso médio e no dia do experimento, foram tratados por via intraperitoneal com volume médio de 0,5 ml das soluções de talidomida, SC-15 ou GI-16 nas concentrações de 10mg/kg ou 50mg/kg. O grupo controle positivo foi tratado intraperitonealmente com 0,5ml de dexametasona a 10mg/kg e o grupo controle negativo com 0,5ml de solução salina (NaCl 0,9%). Posteriormente, mediu-se a espessura da pata esquerda de cada camundongo com a ajuda de um espessímetro (Starret, Mass, USA) (Figura 5).

Após uma hora, inoculou-se no coxim plantar da pata esquerda de cada animal 30µl de solução de carragenina a 2% (diluída em solução fisiológica). Realizou-se a medição do aumento do edema de pata nos tempos de 1, 2, 3, 4,6 e 24 horas após a administração da carragenina (Figura 5).

### Avaliação de edema de pata após estímulo inflamatório com carragenina

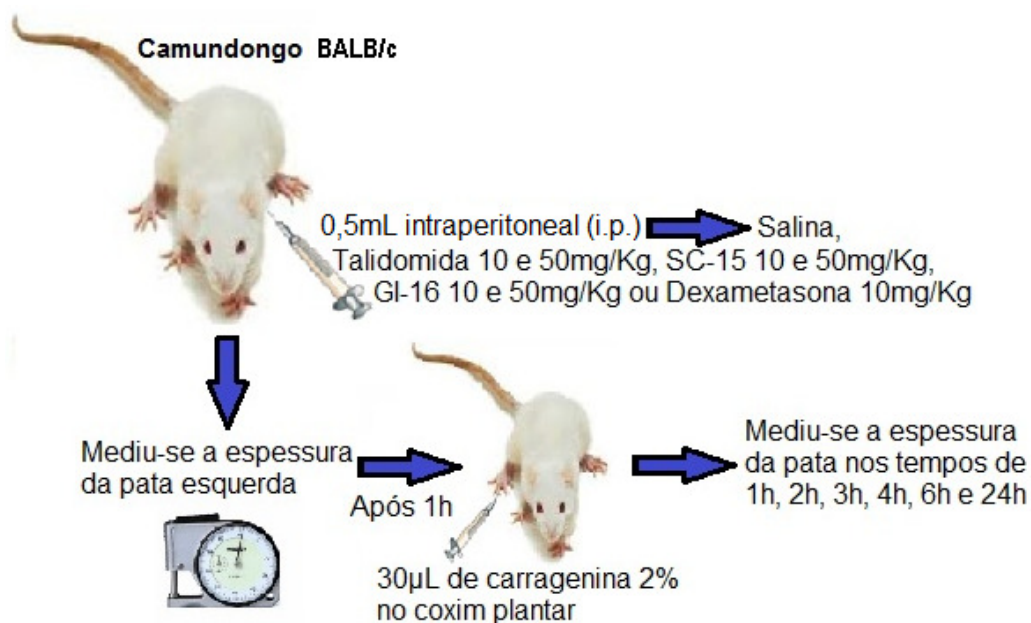


Figura 5. Avaliação de edema de pata após estímulo inflamatório com carragenina. Os camundongos BALB/c foram tratados intraperitonealmente com volume médio de 0,5 ml das soluções de talidomida, SC-15 ou GI-16 nas concentrações de 10mg/kg ou 50mg/kg. Os grupos controle foram tratados intraperitonealmente com 0,5 ml de dexametasona (10mg/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%). Posteriormente, mediui-se a espessura da pata esquerda de cada camundongo com a ajuda de um espessímetro. Após uma hora, inoculou-se no coxim plantar da pata esquerda de cada animal 30µl de solução de carragenina a 2% (diluída em solução fisiológica). Realizou-se a medição do aumento do edema de pata nos tempos de 1, 2, 3, 4,6 e 24 horas após a administração da carragenina

### 3.4-Avaliação da inflamação pulmonar após estímulo com LPS.

Para este experimento, a talidomida foi diluída inicialmente em DMSO 100% e logo após foi solubilizada em solução salina (NaCl 0,9%) resultando numa solução de droga com 3,96% de DMSO.

Para esta etapa, optou-se por usar camundongos C57Bl/6 devido ao fato de os mesmos possuírem melhor resposta ao estímulo inflamatório com LPS. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas com água e ração *ad libitum* a 25°C, no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia-

UFJF. Os animais foram pesados para obtenção de seu peso médio para determinar volume de anestésico e das drogas a serem usadas. Uma vez que o LPS tem um poder de indução de inflamação maior que a carragenina, decidiu-se utilizar todos os compostos, inclusive a dexametasona, nas doses de 20mg/kg ou 50mg/kg. No dia do experimento, os camundongos foram tratados por via intraperitoneal com volume médio de 0,5 ml das soluções de talidomida, SC-15 ou GI-16 nas doses de 20mg/kg ou 50mg/kg. O grupo controle positivo foi tratado com volume médio de 0,5ml de solução de dexametasona (20mg/kg ou 50mg/kg) e o grupo controle negativo com 0,5ml de solução salina (NaCl 0,9%) ambos, por via intraperitoneal. Após uma hora, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com solução de ketamina (10%) e xilasina (2%) na concentração de 6µl/g. Após o estabelecimento do estado anestésico, a traquéia foi exposta por meio de uma pequena incisão mediana através da qual se fez inserção de 50µl de LPS diluído em PBS (concentração de 200µg/ml). Após 24 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical seguido da extração do pulmão esquerdo para obtenção do homogenato, cujo sobrenadante foi utilizado para dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 através de ELISA. O pulmão direito foi extraído para análise histopatológica (Figura 6).

## Avaliação da inflamação pulmonar após estímulo com LPS

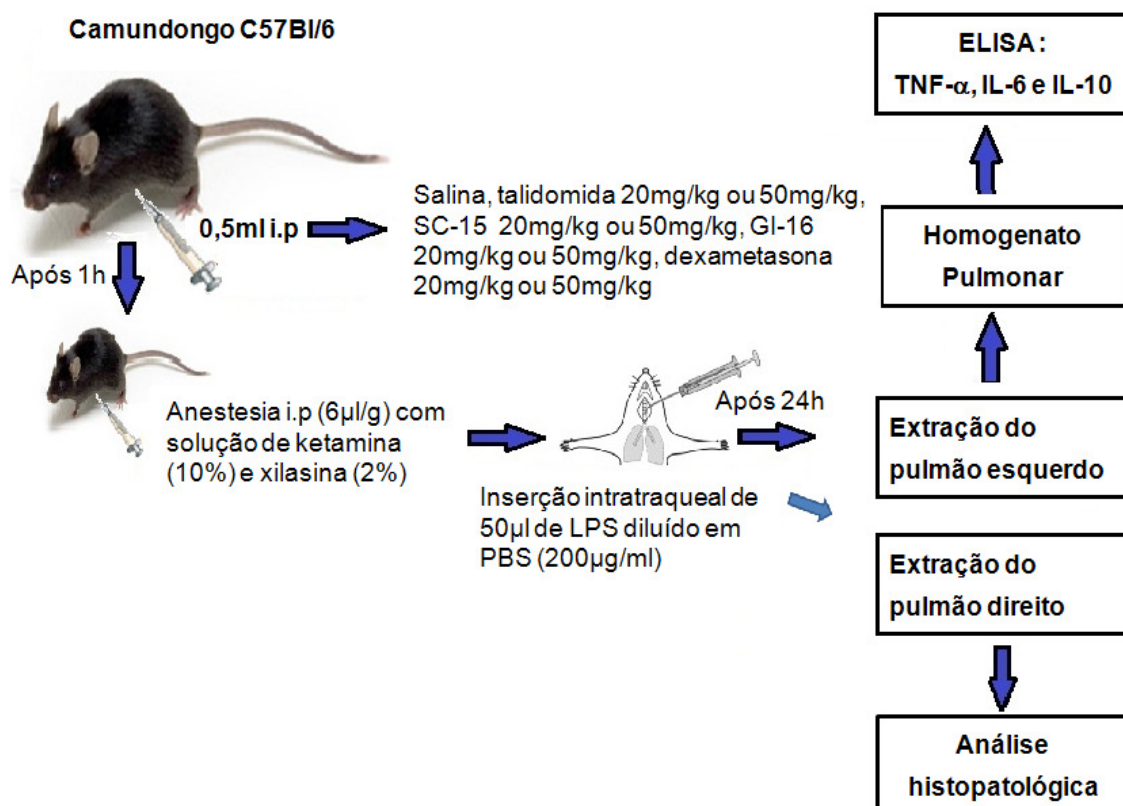


Figura 6. Avaliação da inflamação pulmonar após estímulo com LPS. Os camundongos C57Bl/6 receberam 0,5ml (20mg/kg ou 50mg/kg) de solução de talidomida, SC-15 ou GI-16 intraperitonealmente. Os grupos controle foram tratados com 0,5ml de dexametasona (dose de 20mg/kg ou 50mg/kg) ou 0,5ml de solução salina (NaCl 0,9%) também por via intraperitoneal. Após 1 hora, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com solução de ketamina (10%) e xilasina (2%) na dose de 6µl/g. Após o estabelecimento do estado anestésico, a traquéia foi exposta por meio de uma pequena incisão mediana através da qual se fez inserção de 50µl de LPS diluído em PBS1X (concentração de 200µg/ml). Após 24 horas, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical seguido da extração do pulmão esquerdo para obtenção de seu homogenato, cujo sobrenadante foi utilizado para dosagem das citocinas TNF-α, IL-6 e IL-10 através de ELISA. O pulmão direito foi extraído para análise histopatológica.

### 3.4.1-Obtenção do homogenato pulmonar

Após extração do pulmão esquerdo de cada animal, o órgão foi imediatamente armazenado em freezer -80° C e no dia posterior a remoção do tecido, pesou-se o pulmão para determinação do volume de solução de extração de citocinas a ser utilizado (1ml/100mg de pulmão). A solução de extração de citocinas é composta por 0,4 M de NaCl, 0,1 mM de metil

sulfonilfluorido, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10mM de EDTA e 2µl de aprotinina em 100 ml de água destilada. Em seguida, transferiu-se o pulmão para um tubo resistente, onde foi acrescido o volume de solução de extração de citocinas necessário. Após isso, foi realizada a maceração do pulmão com ajuda de um macerador e posteriormente, realizou-se a centrifugação do órgão a 3.000 rpm a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80° C.

#### **3.4.2 -Efeito modulatório da talidomida e dos análogos SC-15 e GI-16 sobre a produção de citocinas.**

Após obtenção do homogenato, realizou-se a dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, cuja liberação foi previamente induzida por LPS, usando o método de ELISA Kit DuoSet de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (B&D Pharmingen, San Diego, CA, USA). As amostras foram diluídas em PBS com 10% de soro fetal bovino a 1:5 (dosagem de TNF- $\alpha$ ) e 1:3 (dosagem de IL-6). Para dosagem de IL-10, utilizou-se a amostra sem diluições. As placas foram cobertas com anticorpos de captura anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-10 ou anti-IL-6 overnight. Em seguida foram lavadas 3 vezes e bloqueadas com 100µl de solução diluente. Após uma hora, as placas foram lavadas 3 vezes e incubadas com 50µl das amostras e recombinantes novamente em overnight. Concluída a incubação, as placas foram lavadas 5 vezes e foram incubadas com 50µl do anticorpo de detecção e enzima para cada citocina por uma hora seguida de mais 7 lavagens. Logo após inseriu-se 50µl de substrato para verificar formação de cor seguido do acréscimo de 25µl da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para parar a reação seguida de leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm.

#### **3.4.3 - Análise histopatológica do pulmão direito após estímulo inflamatório com LPS**

Após o sacrifício dos camundongos, o pulmão direito de cada animal foi mantido em solução de formaldeído 10% por 24 horas. Após processamento

para desidratação e diafanização do tecido em banhos de álcool e xilol respectivamente, os fragmentos foram emblocados em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram obtidos com auxílio de micrótomo semi-automático e foram capturados em lâminas comuns, para colorações histológicas com hematoxilina-eosina. As imagens foram obtidas através do uso do microscópio Olympus BX51(Olympus Inc., New York, NY, USA) e os resultados registrados pelo software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc. Warrendale, PA, USA).

A injúria pulmonar inflamatória de cada animal foi avaliada usando o método de escore semi-quantitativo, conforme previamente descrito por Simons e colaboradores (1991). Os escores de injúria foram avaliados em 4 graduações: 0 (normal), 1 (leve), 2 (moderado), 3 (intenso) e em quatro categorias: Inflamação intersticial (presença de danos teciduais em zona intersticial decorrentes de reação inflamatória), infiltração celular inflamatória (presença de infiltrados de células do sistema imunológico), congestão (presença de hemácias na zona analisada) e edema (extravasamento de líquido na zona analisada). O total de injúria pulmonar foi calculado pelo adicionamento dos escores individuais de cada categoria.

### **3.5 - Teste de toxicidade aguda**

Para avaliação da toxicidade aguda, foram utilizados ratos Wistar, pois é o modelo animal mais utilizado neste tipo de experimento. Os animais foram tratados, intraperitonealmente, com um volume médio de 0,8 ml de solução salina (NaCl 0,9%), talidomida, SC-15 ou GI-16 (20mg/kg) em dose única, e observados diariamente por 14 dias (no primeiro dia a avaliação foi de hora em hora). A talidomida foi diluída inicialmente em DMSO 100% seguida de diluição em solução fisiológica atingindo uma solução desta droga com 10% de DMSO. Durante todo o período, foram avaliadas eventuais mortes, contorções abdominais, pêlos arrepiados, movimentação, convulsões, alterações no consumo alimentar e hídrico e ganho de peso. Ao fim deste período, os ratos foram eutanasiados por aprofundamento anestésico em éter e submetidos à análise hematológica. Os parâmetros hematológicos: dosagem de hemoglobina, percentual e número de hemácias, segmentados, monócitos, leucócitos



granulares, linfócitos, eosinófilos e plaquetas, foram mensurados através de amostras de sangue obtidas por punção cardíaca. As amostras foram inseridas em tubos com 10% de EDTA. Os dados hematológicos foram obtidos através do uso do aparelho automatizado (COBAS ARGOS 50® – ROCHE *Diagnostic System*, ROCHE Inc., TALLAHASSEE, FLU, USA), que se baseia na contagem e dimensionamento das células mediante medição e detecção de resistência elétrica quando as mesmas passam, através de um líquido condutor, através de uma pequena abertura. Isso gera uma pulsação mensurável cujo número e altura indicam o número de células e seus volumes. Os achados hematológicos foram feitos com confirmação e controle da contagem diferencial de células sanguíneas pelo analista, com auxílio do microscópio *Olympus*® (Olympus Inc., New York, NY, USA). Foram também realizados testes bioquímicos usando amostras de soro dos animais, as quais foram colhidas em tubos sem anticoagulantes e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Foram avaliados os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) (cinética de ultravioleta otimizada), fosfatase alcalina (ensaio colorimétrico enzimático), glicose (glicose oxidase/peroxidase), creatinina (reação de Jaffe's), triglicérides e colesterol (ensaio colorimétrico enzimático). Os parâmetros bioquímicos foram mensurados mediante quantificação fotométrica utilizando aparelho automatizado (COBASMIRA PLUS® – ROCHE *Diagnostic System*) e seus reagentes (ROCHE Inc., FLU, USA). Além disso, realizou-se a extração do fígado, rins (órgãos metabolizadores) e do coração (órgão nobre) dos animais estudados, para análise histopatológica.

### **3.6 - Teste de toxicidade sub-crônica**

Para o teste de toxicidade sub-crônica, também foram utilizados ratos wistar pelos mesmos motivos empregados no teste de toxicidade aguda. Os animais receberam intraperitonealmente, a cada 2 dias, volume médio de 0,8 ml de solução salina (NaCl 0,9%), talidomida, SC-15 ou GI-16 (20mg/kg) e observados por 28 dias (no primeiro de hora em hora). As observações realizadas e os parâmetros bioquímicos e hematológicos mensurados foram os mesmos medidos no teste de toxicidade aguda e pela mesma metodologia

utilizada. Além disso, também realizaram-se a extração do fígado, rins e coração, pelas mesmas razões e metodologia descritas (Figura 7).

### Teste de toxicidade aguda e sub-crônica

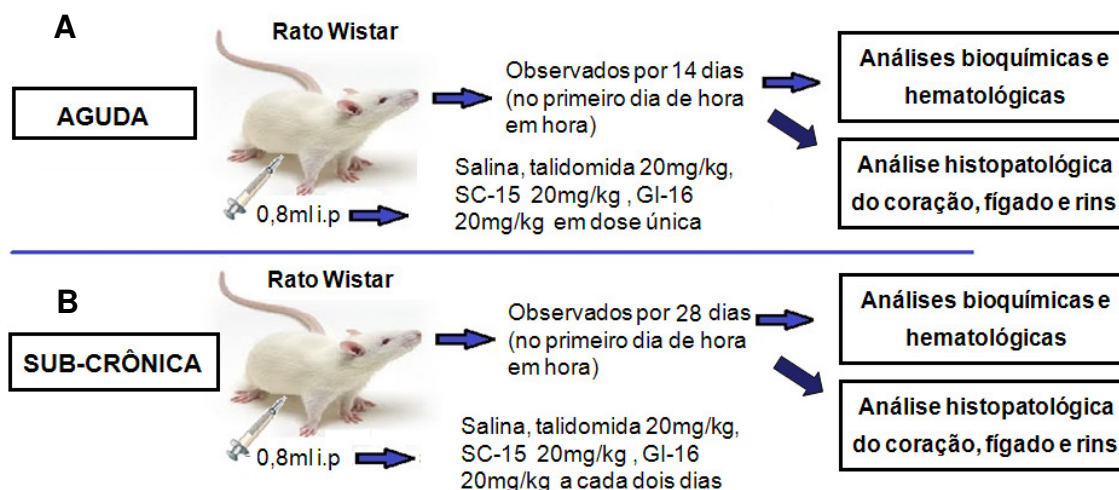


Figura 7. Teste de toxicidade aguda (A) e sub-crônica (B). Ratos Wistar foram tratados com 0,8 ml (20mg/kg) de talidomida, SC-15, GI-16 ou soluções controle (NaCl 0,9% ou NaCl + 10% de DMSO) em dose única (teste de toxicidade aguda) ou a cada dois dias (toxicidade sub-crônica) e foram observados durante 14 dias (teste de toxicidade aguda) ou 28 dias (teste de toxicidade sub-crônica) (no primeiro dia de hora em hora). Após este período realizaram-se as análises bioquímicas e hematológicas e avaliação histopatológica do coração, fígado e rins destes animais.

### 3.7 -Análise histopatológica do coração, fígado e rins.

Após extração do coração, fígado e rins, os mesmos foram fixados por imersão em formalina 4% em PBS por 20 horas. Após processamento para desidratação e diafanização do tecido em banhos de álcool e xilol respectivamente, os fragmentos foram emblocados em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram obtidos com auxílio de micrótomo semi-automático e foram capturados em lâminas comuns para colorações histológicas hematoxilina-eosina. As imagens foram obtidas através do uso do microscópio Olympus BX51 (Olympus Inc., New York, NY, USA) e os resultados registrados pelo software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc. Warrendale, PA, USA). A análise das lâminas se concentrou na veia centrolobular e espaço porta hepáticos (duas estruturas vasculares importantes e indicativas de possível

inflamação), medula e córtex renal (principais zonas renais) e pericárdio, miocárdio e endocárdio (principais camadas cardíacas).

### **3.8 - Análise estatística**

Para dados paramétricos obtidos, utilizou-se o teste ANOVA one-way seguido do teste de Tukey como pós-teste. Para valores de  $p < 0.05$ , os dados foram considerados estatisticamente significativos. Utilizou-se software Graph Pad Prism 5.0 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, USA).

## 4.- RESULTADOS

### 4.1- Avaliação do edema de pata após estímulo inflamatório com carragenina

Como primeira etapa da avaliação da eficácia antiinflamatória *in vivo* dos compostos GI-16 e SC-15, procedeu-se a realização de um modelo de inflamação local através da avaliação do edema de pata mediante inoculação de carragenina a 2%.

A figura 8 mostra que o edema de pata induzido por inoculação subcutânea de carragenina foi significativamente reduzido nos camundongos testados com os análogos SC-15 e GI-16, quando comparados ao grupo controle salina. O composto GI-16 demonstrou atividade de inibição da resposta inflamatória semelhante à talidomida apresentando o edema de pata inferior ao grupo controle salina desde a primeira até vigésima-quarta hora, com edema cerca de 53 a 65% menor na dose de 10mg/kg e cerca de 69% a 77,1% menor na dose de 50mg/kg em relação ao grupo salina, no mesmo intervalo de tempo ( $p < 0,05$ ).

O análogo SC-15 mostrou maior atividade antiinflamatória a 50mg/kg, obtendo ação semelhante à talidomida e dexametasona desde a primeira hora, havendo edema 54 a 65 % menor em comparação ao grupo salina ( $p < 0,05$ ). Na dosagem menor, este análogo exibiu diferença significativa em relação ao grupo controle salina apenas na primeira, terceira e vigésima-quarta hora ( $p < 0,05$ ) (Figura 8).

Em comparação com a dexametasona, usada apenas na concentração de 10mg/kg, o composto GI-16 exibiu capacidade de redução do edema de pata semelhante à dexametasona quando aplicado a 50mg/kg. Já o composto SC-15 teve ação equivalente à dexametasona em todos os intervalos de tempo apenas quando usada a 50mg/kg (Figura 8).

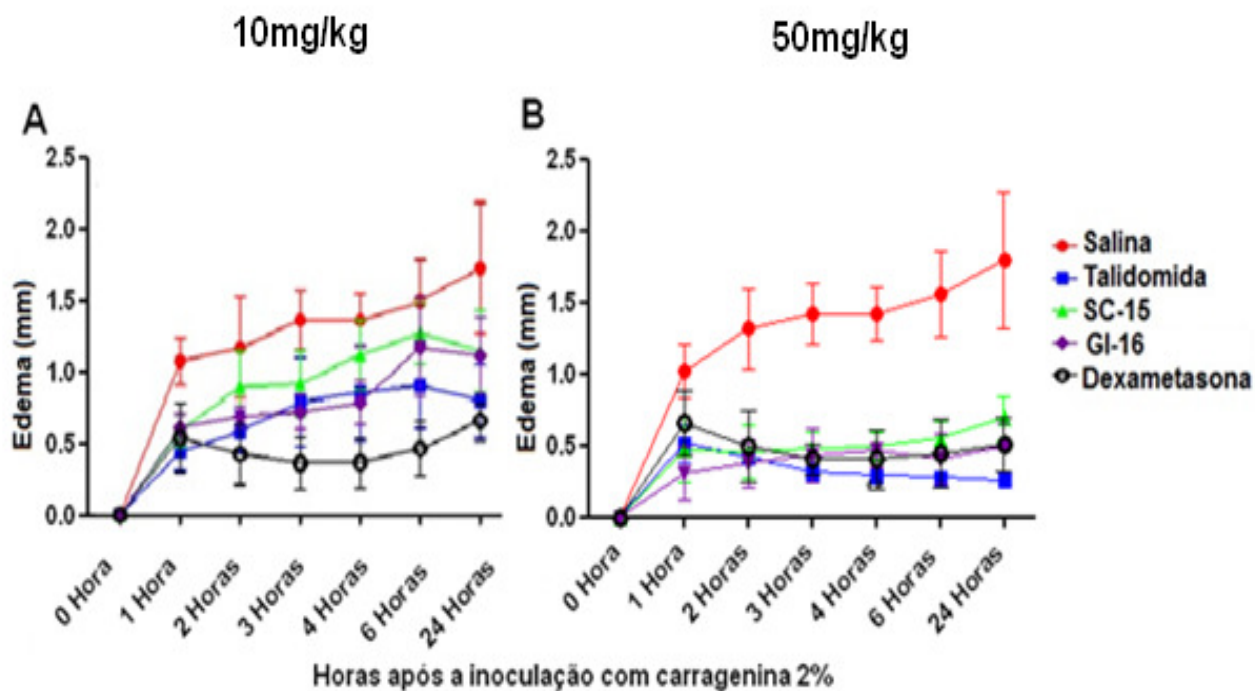


Figura 8. Avaliação do edema de pata induzido por carragenina 2% em camundongos BALB/c submetidos ao tratamento com 0,5ml de talidomida (10mg/kg), SC-15 (10mg/kg), GI-16 (10mg/kg) ou dexametasona (10mg/kg) (A). Avaliação do edema de pata induzido por carragenina 2% em camundongos BALB/c submetidos ao tratamento com 0,5ml de talidomida (50mg/kg), SC-15 (50mg/kg), GI-16 (50mg/kg) ou dexametasona (10mg/kg) (B). Os animais pertencentes ao grupo controle negativo foram tratados com 0,5ml de solução salina (NaCl 0,9%). O edema foi avaliado nos tempos de 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, e 24h após indução de inflamação da pata esquerda por carragenina. Análise estatística feita através de ANOVA e teste Tukey. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão.

## 4.2-Avaliação da inflamação pulmonar após estímulo com LPS

### 4.2.1-Efeito modulatório da talidomida e dos análogos SC-15 e GI-16 sobre a produção de citocinas

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma macromolécula componente da parede celular de bactérias gram-negativas, conferindo sustentabilidade além de proteção contra certos tipos de ataques químicos. Assim como a carragenina, o LPS também é utilizado na imunofarmacologia em testes envolvendo inflamação (FARRETI *et al.*, 2003; PRAUSE *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010). Desta forma, como segundo parâmetro, a modulação da resposta

inflamatória *in vivo* ocasionada pelos compostos SC-15 e GI-16 também foi avaliada através do modelo de inflamação pulmonar induzido por inoculação intratraqueal de LPS (200µg/ml), com a finalidade de se verificar a influência dos análogos deste estudo sobre a produção de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) bem como sua capacidade de induzir a produção da citocina antiinflamatória IL-10.

A figura 9 mostra que o tratamento com os compostos SC-15 e GI-16, tanto a 20mg/kg quanto a 50mg/kg, causou redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , que atingiu valores semelhantes aos obtidos com talidomida e dexametasona sendo os níveis aproximadamente 34% menores que o observado no grupo controle salina ( $p < 0,05$ ). Quanto à produção de IL-6, apenas o composto GI-16 apresentou alta inibição sobre esta citocina quando usado a 20mg/kg (66% de redução em relação ao grupo salina). Já a 50mg/kg, os dois análogos da talidomida inibiram a produção em 74% a 90% de IL-6 que o grupo salina ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística na produção de TNF- $\alpha$  entre os tratamentos com os compostos SC-15 e GI-16 em ambas dosagens adotadas, assim como na produção de IL-6 na dose de 50mg/kg.

Dentre as drogas analisadas, GI16 e dexametasona foram os compostos que mais reduziram os valores de IL-6 em ambas dosagens ( $p < 0,05$ ). Em relação à IL-10, a talidomida e o análogo SC-15 foram capazes de induzir maior liberação desta molécula na dose de 50mg/kg, os demais grupos exibiram valores semelhantes ao grupo salina. ( $p < 0,05$ ). Na menor dose (20mg/kg), nenhum grupo demonstrou produção de IL-10 superior ao grupo salina e não houve diferenças na produção desta citocina entre os demais grupos estudados. (Figura 9)

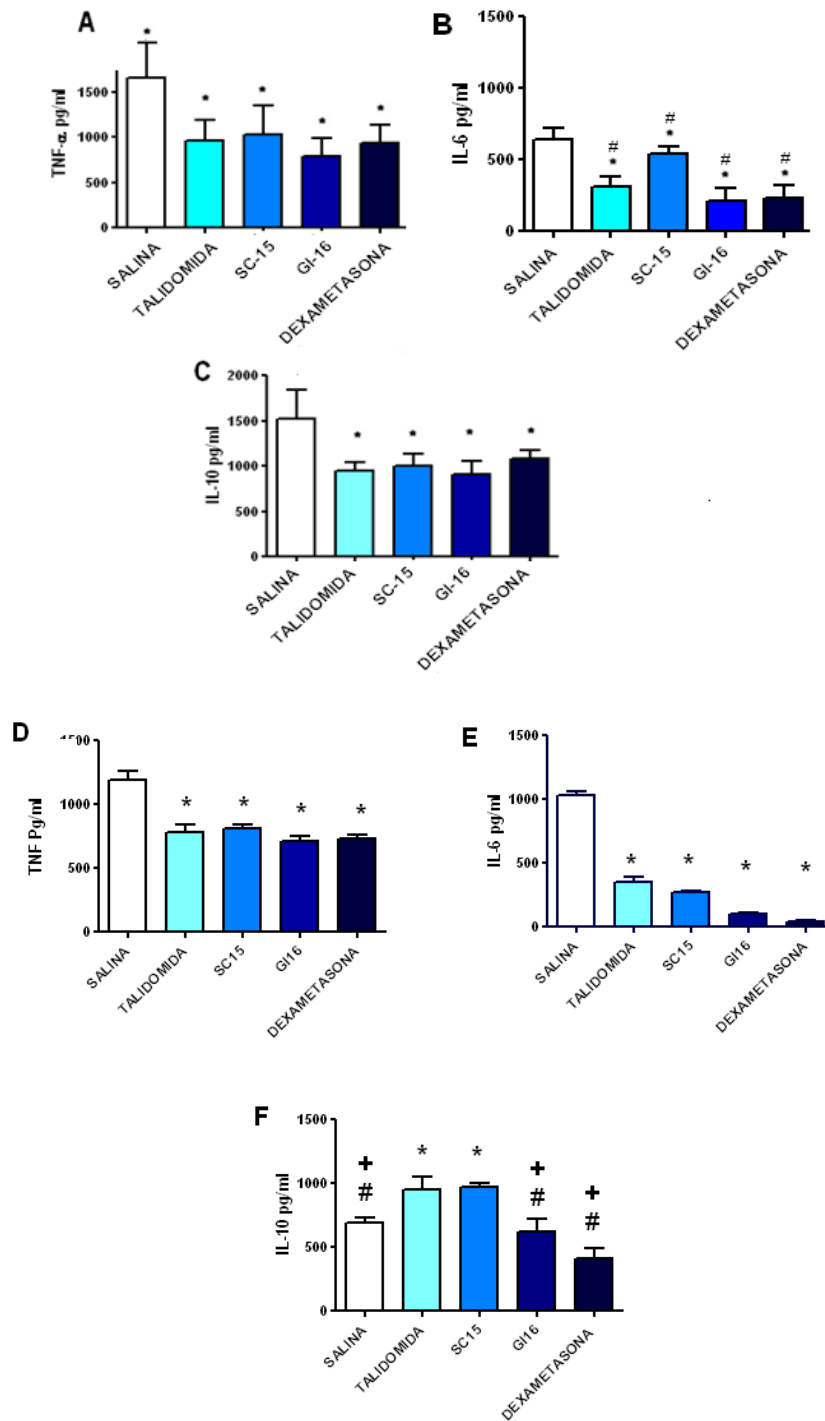


Figura 9. Níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 obtidos do homogenato pulmonar de camundongos C57Bl/6. Os animais foram tratados com 0,5 ml de talidomida, SC-15, GI-16, dexametasona ou solução salina (NaCl 0,9%) nas doses de 20mg/kg (A, B e C) ou 50mg/kg (D, E e F). Após uma hora, os animais foram submetidos à inoculação intratraqueal com LPS (200 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ l). Após 24 horas, os animais foram sacrificados e o pulmão esquerdo foi extraído para obtenção de homogenato cujos sobrenadantes foram utilizados para dosagem de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 através de ELISA. \*= $p$ <0,05 versus salina, #= $p$ <0,05 versus SC-15, + =  $P$ <0,05 versus talidomida.

#### **4.2.2- Análise histopatológica do pulmão direito após estímulo inflamatório com LPS**

Para reforçar os resultados obtidos quanto a dosagem de citocinas pró e antiinflamatórias nos pulmões, a seguir, investigamos a resposta inflamatória em nível tecidual, através da análise histopatológica do pulmão direito dos animais tratados com os análogos da talidomida e, após 1 hora, inoculados com 200 ug/ml de LPS, por via intratraqueal (tabelas 5 e 6 e Figura 10).

Animais do grupo controle salina apresentaram alto nível de inflamação nos pulmões quando comparados aos demais grupos, apresentando acentuado espessamento da parede alveolar e congestão vascular intensa associada à infiltrado inflamatório (principalmente neutrofílico) e edema (Figura 10A-B). Os grupos talidomida e dexametasona, em ambas doses, exibiram leve inflamação, apresentando discreta congestão vascular e edema, com poucas áreas de quadro inflamatório semelhante ao grupo salina (Figuras 10C-D e I-J). O tratamento com o composto SC-15 reduziu consideravelmente a resposta inflamatória nos pulmões apenas na dose de 50 mg/kg. Na dose de 20 mg/kg de SC-15 foram detectadas áreas de congestão, edema e infiltrado de intensidade moderada a intensa (Figura 10E). Em relação à dose de 20 mg/kg, a dose de 50 mg/kg de SC-15 proporcionou uma redução moderada da inflamação tecidual (Figura 10F). O tratamento com o composto GI-16 induziu redução acentuada da resposta inflamatória tecidual, em ambas doses utilizadas, sendo detectadas leve congestão capilar e discreto infiltrado inflamatório (Figuras 10 G-H).



**Tabela 5.** Escores de injúria inflamatória pulmonar induzida por LPS em camundongos tratados com talidomida ou análogos (SC-15 ou GI-16) a 20mg/kg

Categoria <sup>a</sup>	Grupos <sup>b</sup>				
	Salina	Talidomida	SC-15	GI-16	Dexametasona
Inflamação intersticial	3 <sup>c</sup>	1-2	2-3	1-2	1-2
Infiltração celular inflamatória	3	1-2	2-3	1-2	1-2
Congestão	3	1-2	2-3	1-2	1-2
Edema	3	1-2	2-3	1-2	1-2
Escore inflamatório total	12	4-8	8-12	4-8	4-8

a- Categoria de inflamação

b- Animais dos grupos talidomida, SC-15, GI-16 ,dexametasona e salina foram inoculados com 50µl LPS 200µg/ml. 1 hora após o tratamento com 0,5ml de talidomida, SC-15, GI-16 ou dexametasona (todos a 20mg/kg). Após 24 horas da inoculação do LPS, os animais foram sacrificados e o pulmão direito dos animais foram isolados e submetidos a análise histopatológica, conforme descrito na metodologia.

c-Escore de injúria inflamatória conforme descrito na metodologia

**Tabela 6:** Escores de injúria inflamatória pulmonar induzida por LPS em camundongos tratados com talidomida ou análogos (SC-15 ou GI-16) a 50mg/kg.

Categoria <sup>a</sup>	Grupos <sup>b</sup>				
	Salina	Talidomida	SC-15	GI-16	Dexametasona
Inflamação intersticial	3	1	2	1	1
Infiltração celular inflamatória	3	1	2	1	1
Congestão	3	1	2	1	1
Edema	3	1	2	1	1
Escore inflamatório total	12	4	8	4	4

a- Categoria de inflamação

b- Animais dos grupos talidomida, SC-15, GI-16 ,dexametasona ou salina foram inoculados com 50µl de LPS 200µg/ml. 1 hora após o tratamento com 0,5 ml de talidomida, SC-15, GI-16 ou dexametasona, todos a 50mg/kg. Após 24 horas da inoculação do LPS, os animais foram sacrificados e o pulmão direito dos animais foram isolados e submetidos a análise histopatológica, conforme descrito na metodologia.

c-Escore de injúria inflamatória conforme descrito na metodologia

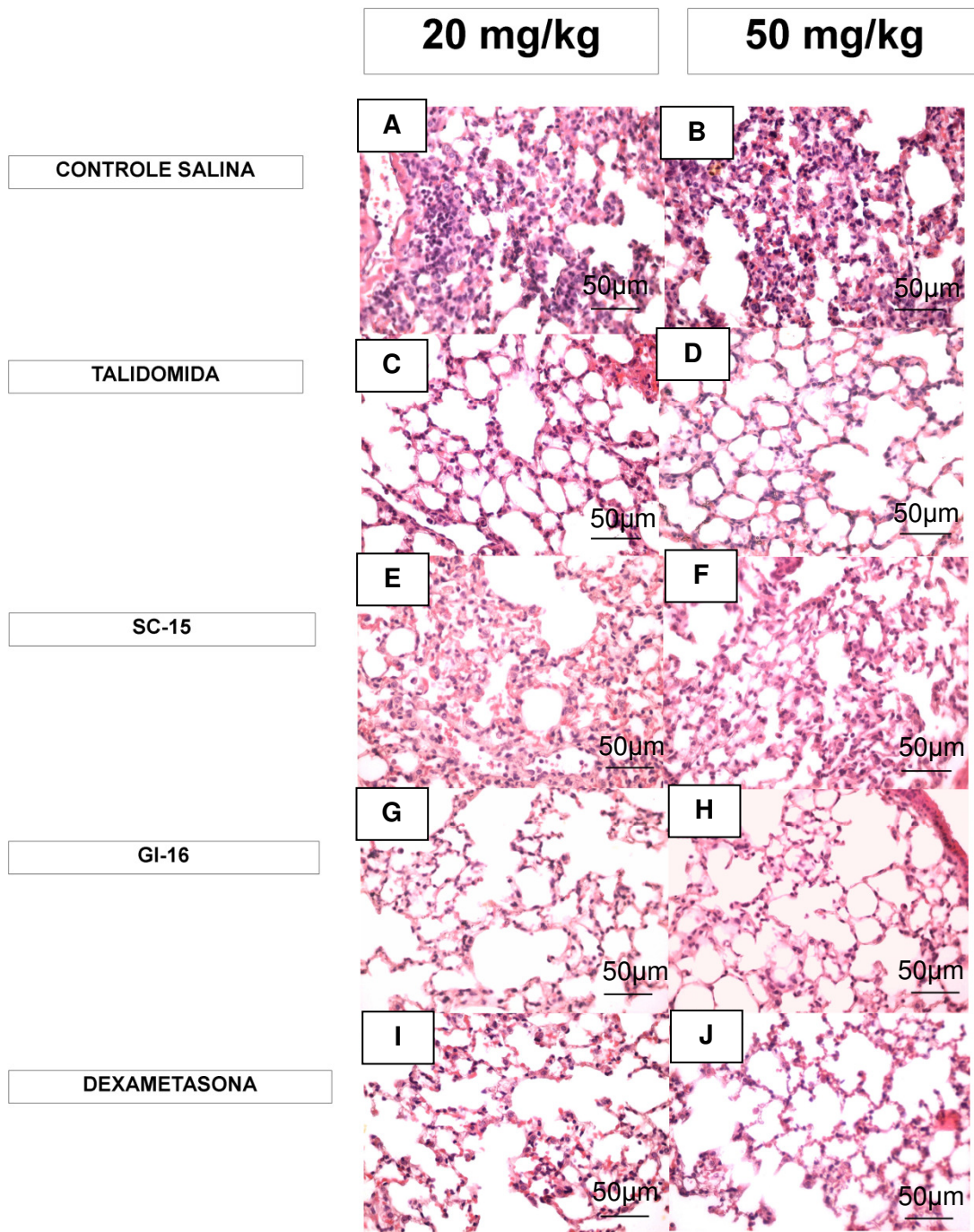


Figura 10. Microscopia ótica de corte de tecido pulmonar. Camundongos C57Bl/6 foram tratados com 0,8ml de talidomida (C-D), GI-16(G-H), SC-15(E-F), dexametasona (I-J) ou solução salina (NaCl 0,9%) (A-B) nas doses de 20mg/kg ou 50 mg/kg. Após uma hora, os animais foram estimulados com LPS (200µg/ml) por via intratraqueal. Vinte e quatro horas após indução inflamatória com LPS, o pulmão direito dos animais foram isolados e submetidos à análise histopatológica. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina aumento de 40x escala de barra=50µm..

### **4.3 - Teste de toxicidade aguda**

Para monitoramento de possíveis efeitos adversos ocasionados pelo uso imediato de determinados fármacos, o teste mais utilizado é o de avaliação da toxicidade aguda, que proporciona rápida resposta na estimativa de ações prejudiciais de um agente que possa oferecer riscos a saúde dos usuários. Os testes de toxicidade aguda podem durar de 14 a 28 dias (tempo necessário para observação de efeitos visíveis da droga e seus efeitos na fisiologia do animal), com exposição a concentrações geralmente elevadas administradas em uma única dose de determinado composto químico, avaliando-se critérios como mortes, imobilidades, alterações do apetite e do peso, alterações bioquímicas e hematológicas (RAND e PETROCELLI, 1985; FDA, 2003).

A partir da avaliação de toxicidade aguda é possível determinar a dose letal (LD50), que se caracteriza por ser a concentração necessária para ocasionar o óbito de 50% dos animais utilizados no estudo num período de até 14 dias (COSTA, et al., 2008). Drogas novas devem ser testadas partindo-se do pressuposto que são muito tóxicas, sendo utilizadas inicialmente numa concentração menor que 25mg/kg (ANVISA, 1996).

Foi observado que durante os 14 dias de experimentação, após administração de dose única de 20mg/kg dos compostos GI-16 e SC-15, os ratos Wistar avaliados mostraram, imediatamente ou durante o período de avaliação, um quadro de tolerância à medicação. Nenhum animal avaliado veio a óbito ou apresentou qualquer sinal clínico de toxicidade aguda, incluindo o grupo controle salina e o grupo talidomida (dados não mostrados).

#### **4.3.1 -Consumo alimentar e hídrico**

Como primeiro parâmetro de teste de toxicidade analisado, avaliou-se o consumo médio de alimento (ração) e água durante as 2 semanas de investigação. Os resultados mostram que os ratos machos consumiram mais água e alimento que os ratos fêmeas independente do grupo testado. Quanto aos tratamentos, o uso de talidomida ou dos compostos GI-16 e SC-15, em

dose única, não exerceu influência sobre a sede ou apetite destes animais (Figura 11).

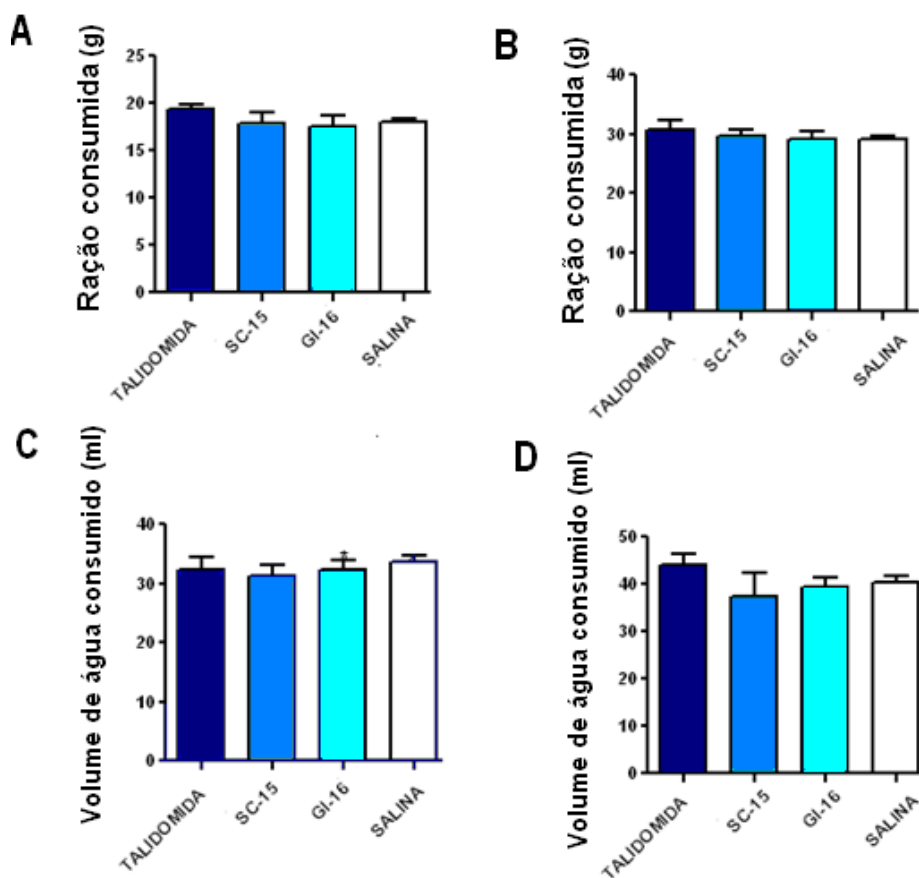


Figura 11. Teste de toxicidade aguda. Avaliação do consumo alimentar e hídrico. Ratos Wistar fêmeas (A e C) e machos (B e D) foram tratados com dose única (20mg/kg, 0,8 ml) de talidomida, SC-15, GI-16 ou solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml) por via intraperitoneal. O volume de água consumido em ml e a quantidade de ração ingerido em gramas foram avaliados diariamente durante 14 dias. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculado a partir das médias obtidas nas avaliações feitas diariamente nos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.3.2 - Ganho de Peso.

A seguir, avaliou-se a influência dos compostos SC-15 e GI-16 sobre o ganho de peso dos animais estudados. Os resultados mostram que houve tendência de ganho maior entre os ratos machos. Já entre os tratamentos aplicados, não houve diferenças significativas durante as 2 semanas do experimento (Figura 12).

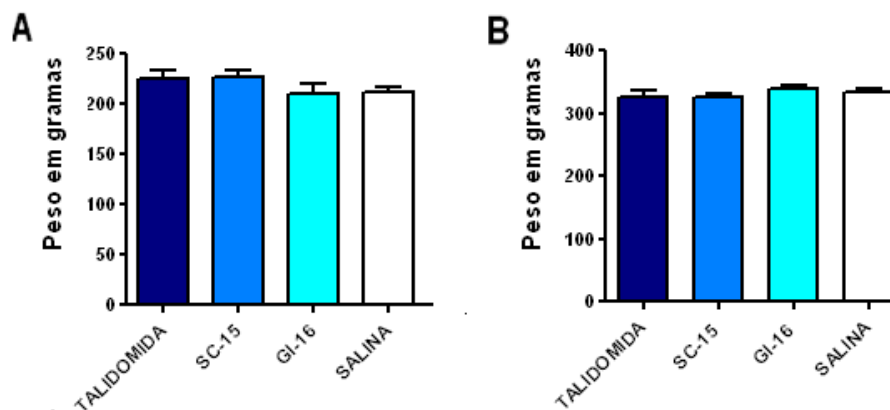


Figura 12. Teste de toxicidade aguda. Avaliação do ganho de peso. Ratos Wistar fêmeas (A) e machos (B) foram tratados com dose única (20mg/kg, 0,8 ml) de talidomida, SC-15, GI-16, ou solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml) por via intraperitoneal. O ganho de peso em gramas foi avaliado a cada 7 dias durante 14 dias. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculado a partir das médias obtidas nas avaliações feitas semanalmente nos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

### 4.3.3 - Parâmetros bioquímicos

#### 4.3.3.1-Função hepática

As provas de função hepática são uma série de avaliações laboratoriais bioquímicas clínicas realizadas para se obter informações sobre o estado do fígado do paciente. Consiste principalmente na avaliação de aspectos como tamanho, condições das vias biliares e na dosagem sorológica de enzimas hepáticas, com a alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e a fosfatase alcalina (FAL). Diversos fármacos podem sofrer metabolização hepática podendo ocasionar danos ao fígado que se traduzem em níveis elevados destas enzimas (ROSALKI *et al.*, 1999). Desta maneira, verificou-se se os compostos SC-15 e GI-16 exercem alguma ação tóxica sobre o fígado através da dosagem sorológica das enzimas ALT, AST e FAL.

As provas de função hepática dos testes de toxicidade aguda demonstraram que não houve alterações significativas nas transaminases, apresentando produção de AST, ALT e fosfatase alcalina sem diferenças consideráveis entre os tratamentos e ratos machos e fêmeas (Figura 13).

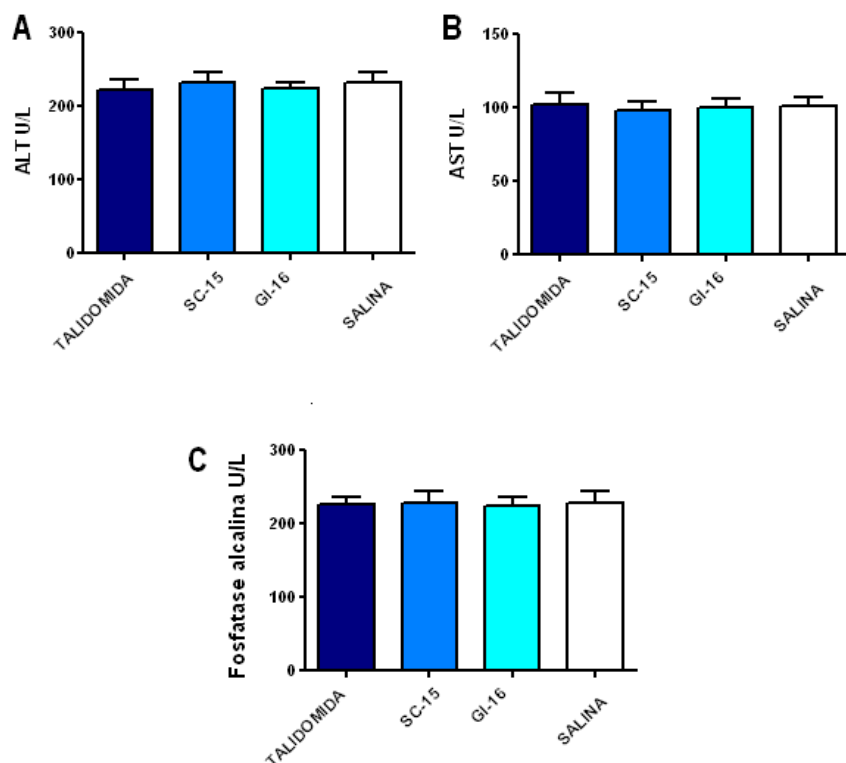


Figura 13. Teste de toxicidade aguda. Níveis sorológicos de alanina aminotransferase (ALT) (A), aspartato aminotransferase (AST) (B) e fosfatase alcalina (C). Ratos Wistar foram tratados com dose única (20mg/kg, 0,8ml) de talidomida, SC-15, GI-16 ou solução salina (NaCl 0,9 %, 0,8ml). As transaminases em U/L foram mensuradas ao fim dos 14 dias de investigação. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculado nos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.3.3.2 - Perfil glicêmico e lipídico

Alguns compostos farmacológicos são capazes de ocasionar alterações metabólicas e danos a determinados órgãos podendo refletir no apetite, níveis glicêmicos e lipídicos. O efeito sedativo que a talidomida e alguns de seus análogos proporcionam podem interferir nestes parâmetros, podendo ocasionar alterações do apetite e sonolência, interferindo na taxa metabólica e no consumo de glicose e gorduras (PERRI III e SYLVIA, 2003).

Assim, avaliou-se a possível influência dos compostos SC-15 e GI-16 sobre os níveis glicêmicos e lipídicos como mais um fator de avaliação metabólica.

Os resultados mostram que os tratamentos aplicados em dose única não promovem alterações significantes nos níveis de triglicérides, colesterol total e

glicose. Os valores também foram semelhantes entre machos e fêmeas (Figura 14).

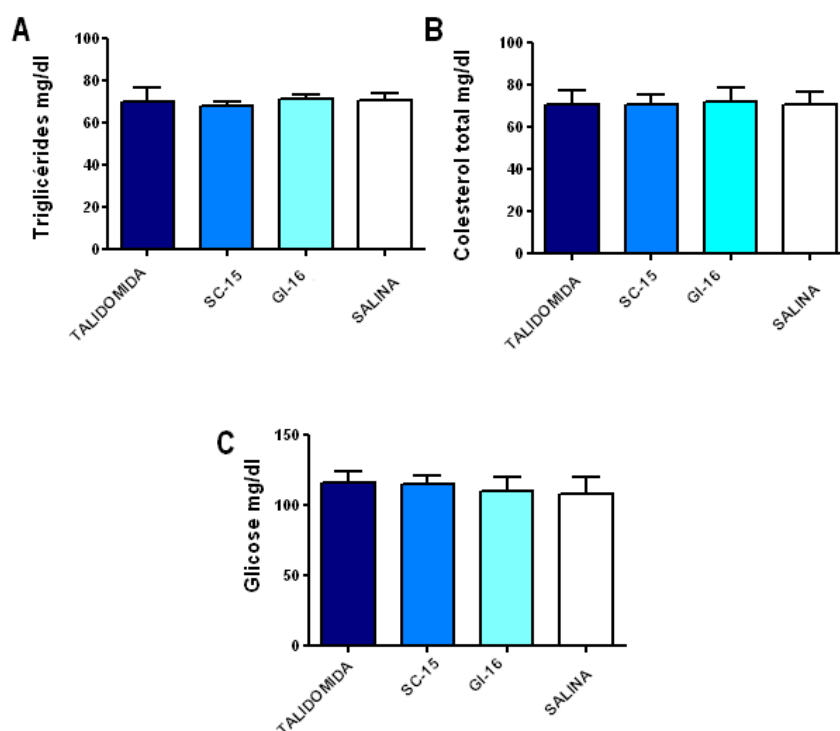


Figura 14. Teste de toxicidade aguda. Níveis sorológicos de triglicérides (A), colesterol total (B) e glicose (C). Ratos Wistar foram tratados com dose única (20mg/kg, 0,8ml) de talidomida, SC-15, GI-16 ou solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml). Os perfis lipídico e glicêmico em mg/dl foram mensurados ao fim dos 14 dias de investigação. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculado nos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.3.3.3 - Função renal

As provas de função renal são amplamente utilizadas para a verificação da integridade e capacidade de filtração renal. Na medicina e avaliações laboratoriais utiliza-se a avaliação do clearance da creatinina como principal elemento da atividade dos rins através da comparação de seus níveis renais e sanguíneos (SODRÉ *et al.*, 2007).

Drogas hidrossolúveis sofrem ampla metabolização nos rins, podendo ocasionar danos a esses órgãos com o passar do tempo (SODRÉ *et al.*, 2007). Uma vez que os análogos SC-15 e GI-16 são hidrossolúveis e passíveis deste tipo de metabolização, realizou-se a mensuração dos níveis de creatinina nos

ratos Wistar estudados. Os tratamentos com talidomida ou com os compostos SC-15 e GI-16 não alteraram os níveis de creatinina, apresentando valores semelhantes ao grupo controle salina não diferindo entre machos e fêmeas (Figura15).

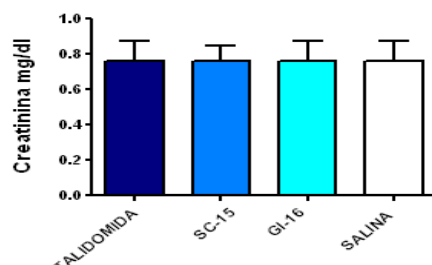


Figura 15. Teste de toxicidade aguda. Nível sorológico de creatinina. Ratos Wistar foram tratados com dose única (20mg/kg, 0,8ml) de talidomida, SC-15, GI-16 ou solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml). Os níveis de creatinina foram mensurados ao fim de 14 dias de investigação. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculado a partir das médias obtidas da análise urinária e sorológica dos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.3.4 -Parâmetros hematológicos

Além das possíveis alterações metabólicas, diversas drogas podem modular os parâmetros hematológicos como a hematopoese, atividade plaquetária e linfocitária entre outros. A talidomida pode ter por efeitos adversos redução leucocitária e outras alterações hematológicas (PERRI III e SYLVIA,2003). Desta forma, além dos aspectos bioquímicos, avaliou-se a possível influência dos compostos SC-15 e GI-16 sobre o número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos granulares, linfócitos, plaquetas, segmentados.

##### 4.3.4.1 - Série Vermelha

Com relação aos parâmetros hematológicos da série vermelha, os tratamentos com SC-15 e GI-16 demonstraram não afetar os níveis de hemoglobina e de hemácias dos animais testados. Os níveis de hemácias, hematócrito e hemoglobina não diferiram entre os grupos e apresentaram valores semelhantes entre machos e fêmeas (Figura 16).



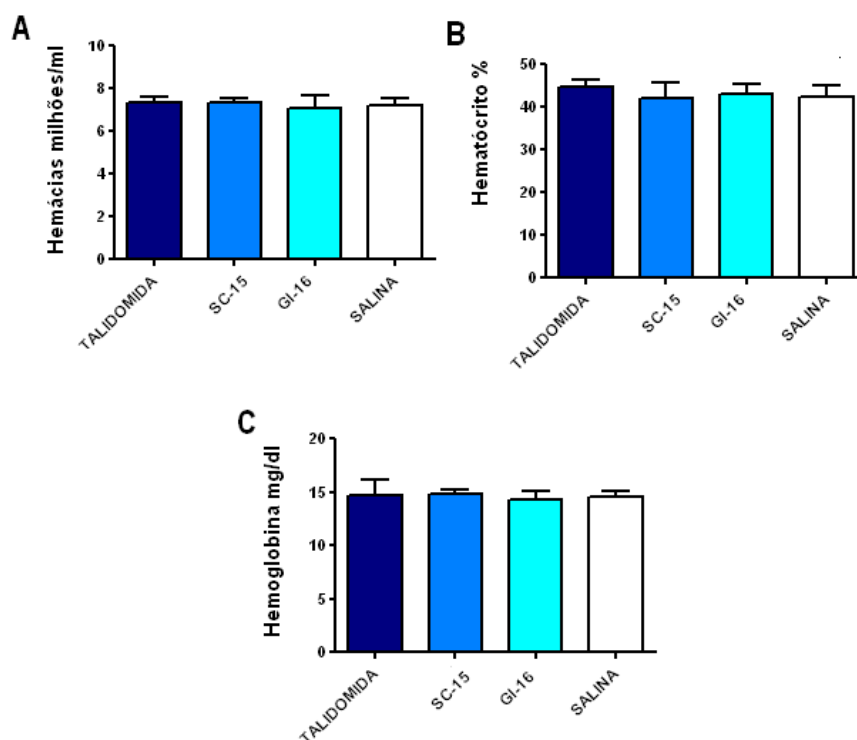


Figura 16. Teste de toxicidade aguda. Número de hemácias (milhões/ml) (A), hematócrito (%) (B) e nível de hemoglobina em mg/dl (C). Ratos Wistar foram tratados com dose única (20mg/kg, 0,8ml) de talidomida, SC-15, GI-16 ou solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml). Os parâmetros hematológicos da série vermelha foram mensurados ao fim de 14 dias de investigação. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculados dos soros dos animais pertencentes aos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.3.4.2 - Série branca e plaquetária

A figura 17 mostra que os parâmetros hematológicos da série branca e plaquetária não se alteraram em decorrência dos tratamentos com dose única dos compostos SC-15 e GI-16, não afetando os níveis de leucócitos granulares, monócitos, segmentados, linfócitos, plaquetas e eosinófilos, não diferindo estatisticamente entre os grupos e apresentaram valores semelhantes entre machos e fêmeas (Figura 17).

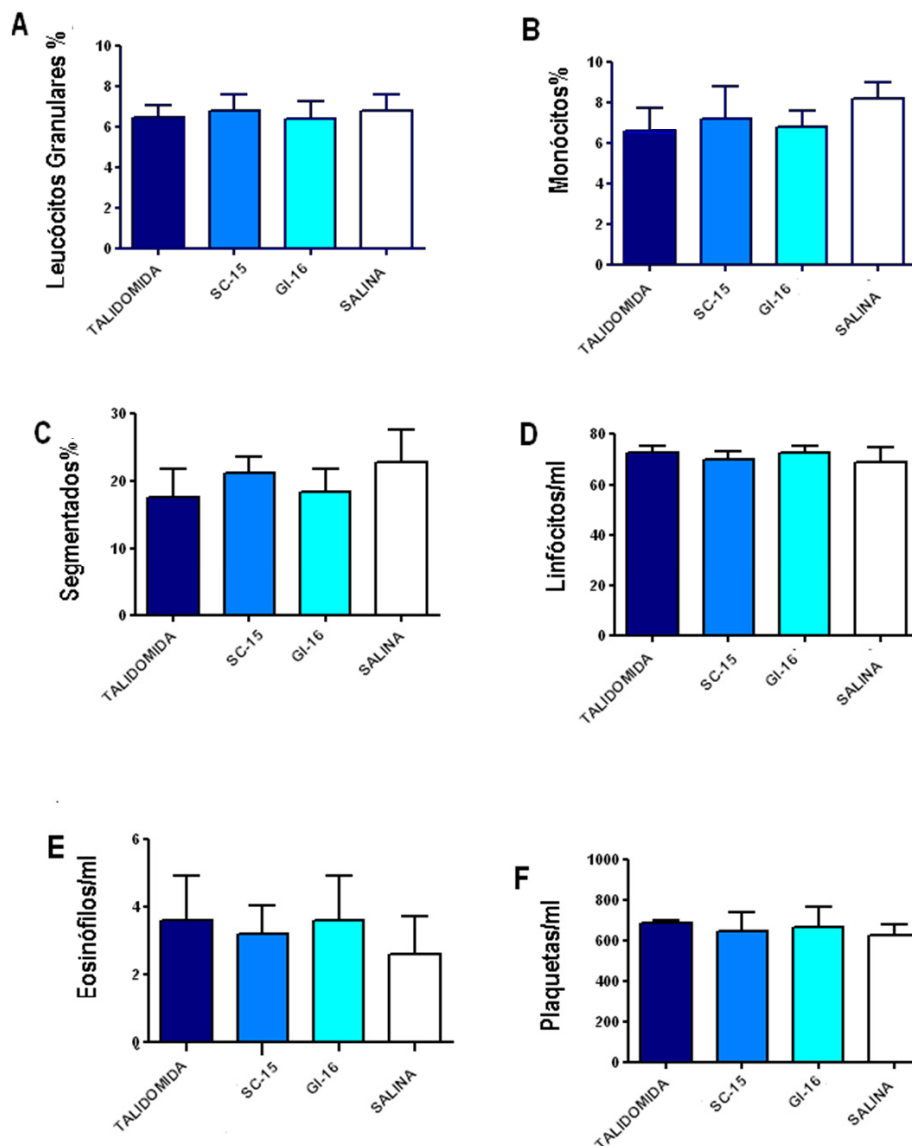


Figura 17. Teste de toxicidade aguda. Número de leucócitos granulares (%) (A), monócitos (%) (B), segmentados (%) (C), linfócitos/ml (D), eosinófilos/ml (E) e plaquetas/ml (F). Ratos Wistar foram tratados com dose única (20mg/kg, 0,8ml) de talidomida, SC-15, GI-16 ou solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml). O perfil hematológico das séries branca e plaquetária foi mensurado ao fim de 14 dias de investigação. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculado do soro dos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.4 - Teste de toxicidade sub-crônica

Ao contrário dos testes de toxicidade aguda, os testes de toxicidade sub-crônica avaliam o possível efeito tóxico de certos compostos após exposição prolongada a doses acumulativas ou frequentes de agente tóxico. Este tipo de avaliação pode durar de 21 a 90 dias em roedores (ANIVISA, 1996; ROMANELLI, 2004). Neste estudo avaliamos um período de 28 dias. Os

parâmetros avaliados foram os mesmos já descritos na avaliação da toxicidade aguda, pelas mesmas justificativas. Os dados obtidos mostram que nenhum animal estudado veio a óbito ou apresentou sinais de toxicidade sub-crônica, imediatamente ou durante os outros dias do período de 28 dias avaliado (dados não mostrados).

#### **4.4.1 -Consumo alimentar e hídrico**

Com relação ao consumo alimentar e hídrico, os resultados diferiram entre os sexos. Os ratos machos demonstraram um maior consumo de água e ração se comparados com os ratos fêmeas. Em relação aos tratamentos aplicados, percebeu-se discreta tendência de redução do apetite e do consumo de água nos machos tratados com talidomida ou com os compostos SC-15 e GI-16 em comparação aos grupos controle (salina e DMSO-salina). Quanto aos ratos fêmeas, houve uma leve redução no consumo de água nos animais tratados com talidomida ou GI-16 se comparados a estes mesmos grupos controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 18).

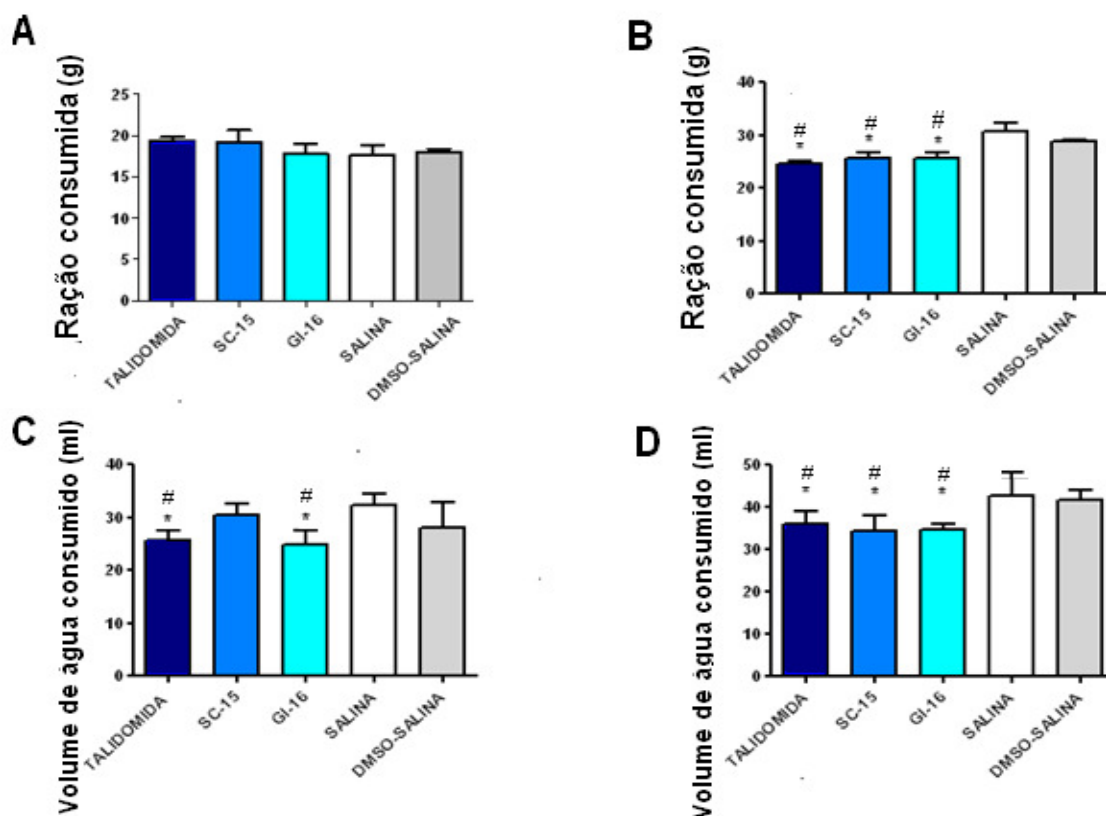


Figura 18. Teste de toxicidade sub-crônica. Avaliação do consumo alimentar e hídrico. Ratos Wistar fêmeas (A e C) e machos (B e D) foram tratados a cada dois dias (20mg/kg, 0,8 ml) com talidomida, SC-15, GI-16 soluções controle (0,8ml de NaCl 0,9% ou NaCl +10% de DMSO) por via intraperitoneal. O volume de água consumido em ml e a quantidade de ração ingerido em gramas foram avaliados diariamente durante 28 dias. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculado a partir das médias obtidas nas avaliações feitas diariamente nos diferentes grupos testados. \*= $p < 0,05$  versus salina, #= $p < 0,05$  versus DMSO-salina através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.4.2 - Ganho de peso.

Os resultados obtidos mostram que os ratos machos tiveram um maior ganho de peso se comparados com as fêmeas. Os tratamentos com os compostos GI-16 e SC-15 não influenciaram o aumento de peso dos animais quando comparados ao grupo talidomida ou qualquer outro grupo, em ambos sexos estudados (Figura 19).

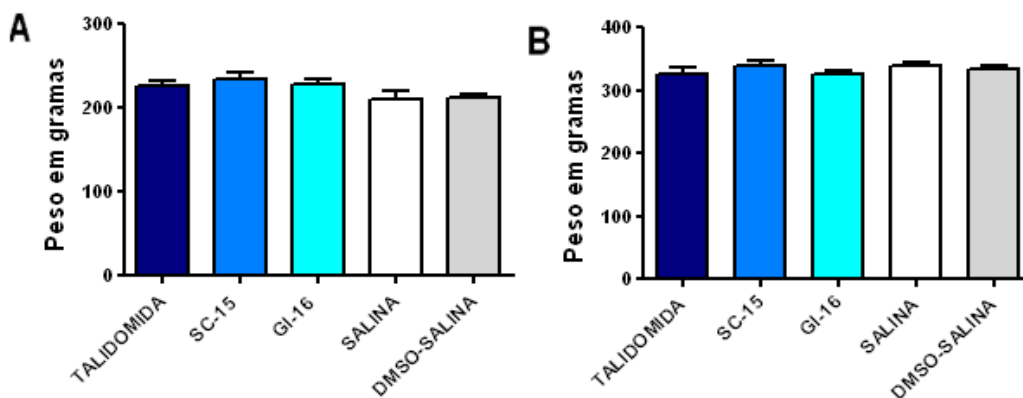


Figura 19. Teste de toxicidade sub-crônica. Avaliação do ganho de peso. Ratos Wistar fêmeas (A) e machos (B) foram tratados a cada dois dias (20mg/kg, 0,8 ml) com talidomida, SC-15, GI-16, soluções controle (0,8ml de NaCl 0,9% ou NaCl +10% de DMSO) por via intraperitoneal. O ganho de peso em gramas foi avaliado a cada 4 dias durante 28 dias. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculado a partir das médias obtidas por cada semana das avaliações feitas nos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.4.3 - Parâmetros bioquímicos

##### 4.4.3.1 - Função hepática

Assim como no teste de toxicidade aguda, os tratamentos com os compostos SC-15 e GI-16 não alteraram os níveis das transaminases hepáticas nos testes de toxicidade sub-crônica. A produção de AST, ALT e fosfatase alcalina foi semelhante entre os grupos, não havendo diferença significativa em relação ao grupo controle salina ou ao grupo controle DMSO-salina. Não foram detectadas diferenças entre animais machos e fêmeas (Figura 20).

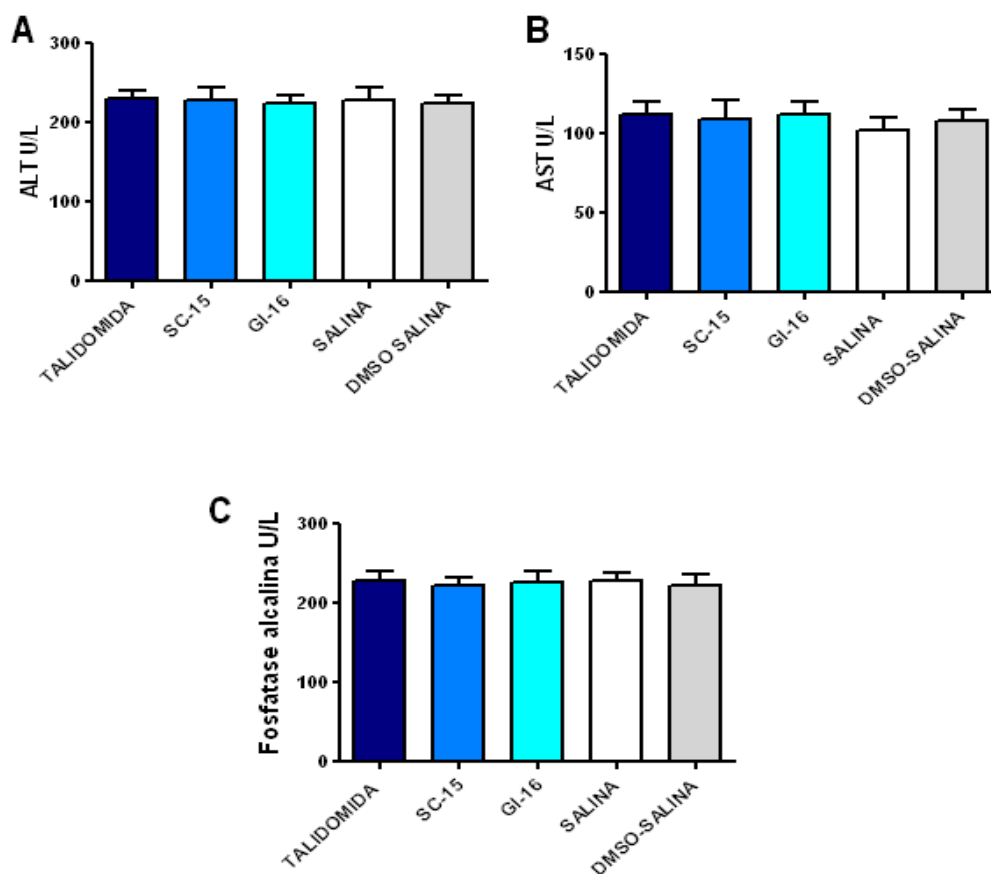


Figura 20. Teste de toxicidade sub-crônica. Níveis sorológicos de alanina aminotransferase (ALT) (A), aspartato amino transferase (AST) (B) e fosfatase alcalina (C). Ratos Wistar foram tratados a cada dois dias (20mg/kg, 0,8ml) com talidomida, SC-15, GI-16 ou soluções controle (0,8ml de NaCl 0,9% ou NaCl +10% de DMSO). As transaminases em U/L foram mensuradas ao fim dos 28 dias de investigação. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculado nos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.4.3.2 - Perfil glicêmico e lipídico

Os tratamentos com talidomida ou com os compostos SC-15 e GI-16 demonstraram não afetar os níveis de triglicérides, colesterol total e glicose, exibindo valores semelhantes entre grupos testados e entre machos e fêmeas (Figura 21).

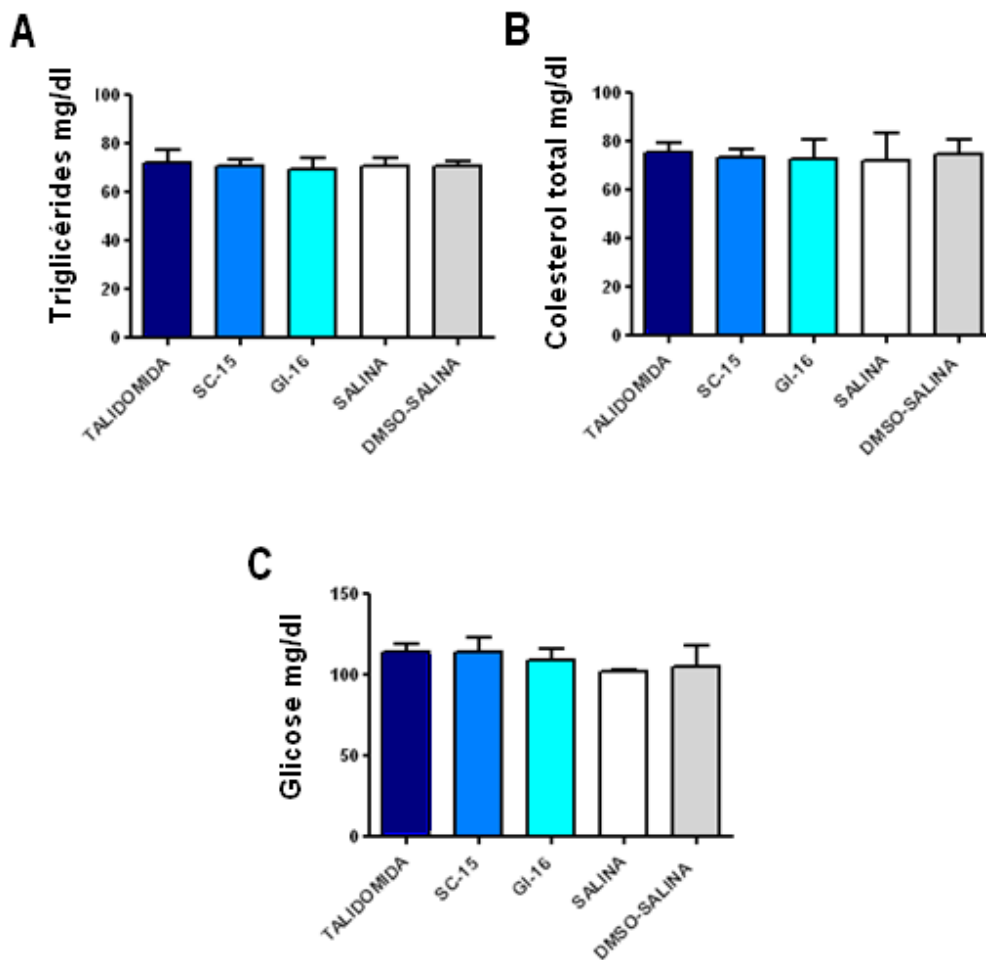


Figura 21. Teste de toxicidade sub-crônica. Níveis sorológicos de triglicérides (A), colesterol total (B) e glicose (C). Ratos Wistar foram tratados a cada dois dias (20mg/kg, 0,8ml) com talidomida, SC-15, GI-16 ou soluções controle (0,8ml de NaCl 0,9% ou NaCl +10% de DMSO). Os perfis lipídico e glicêmico em mg/dl foram mensurados ao fim dos 28 dias de investigação. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculado nos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.4.3.3 - Função renal

A figura 22 mostra que os tratamentos a cada dois dias com os compostos GI-16 e SC-15 não afetaram a atividade renal apresentando produção de creatinina semelhantes aos demais grupos e entre machos e fêmeas.

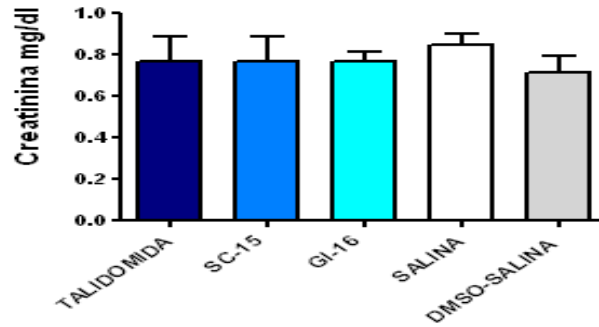


Figura 22. Teste de toxicidade sub-crônica. Nível sorológico de creatinina. Ratos Wistar foram tratados a cada dois dias (20mg/kg, 0,8ml) com talidomida, SC-15, GI-16 ou soluções controle (0,8ml de NaCl 0,9% ou NaCl +10% de DMSO). Os níveis de creatinina foram mensurados ao fim de 28 dias de investigação. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculado a partir das médias obtidas da análise urinária e sorológica dos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.4.2 - Parâmetros hematológicos

##### 4.4.2.1 - Série vermelha

Com relação aos parâmetros hematológicos da série vermelha, assim como no teste de toxicidade aguda, os tratamentos com SC-15 e GI-16 não afetaram os níveis de hemoglobina e de hemácias dos animais testados. Os níveis de hemácias, hematócrito e hemoglobina não diferiram entre os grupos e apresentaram valores semelhantes entre machos e fêmeas (Figura 23).



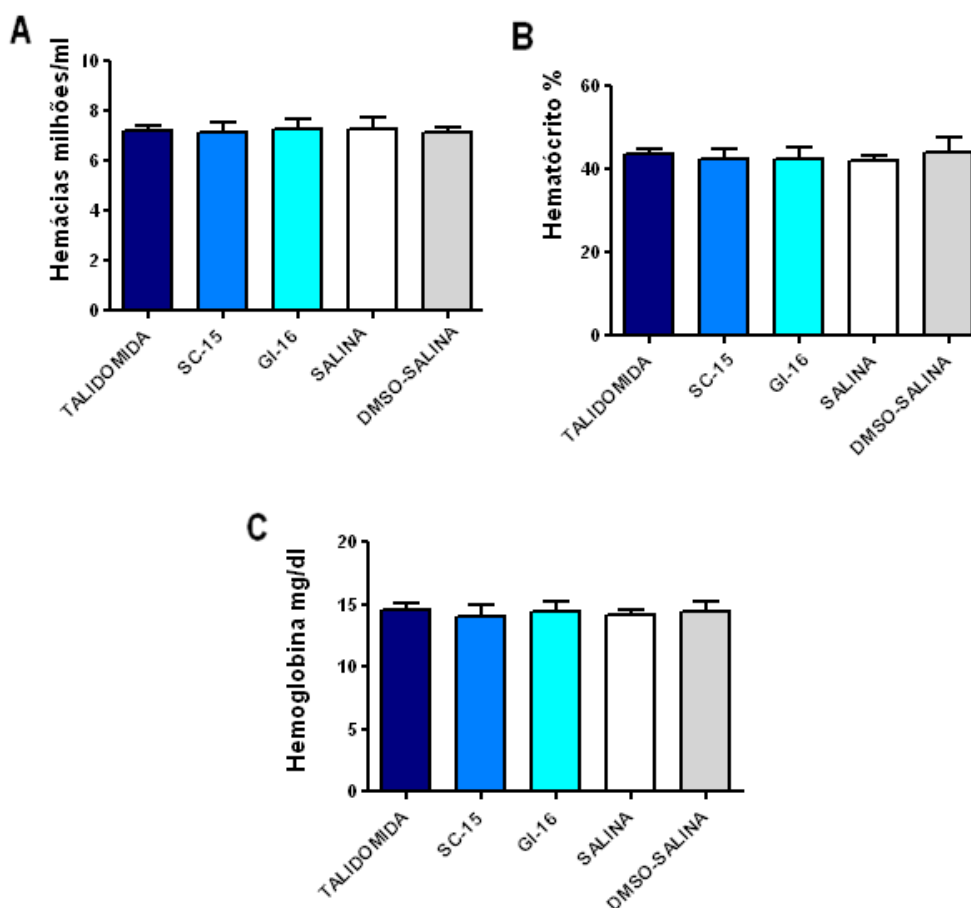


Figura 23. Teste de toxicidade sub-crônica. Número de hemácias (milhões/ml) (A), hematócrito (%) (B) e nível de hemoglobina em mg/dl (C). Ratos Wistar foram tratados a cada dois dias (20mg/kg, 0,8ml) com talidomida, SC-15, GI-16 ou soluções controle (0,8ml de NaCl 0,9% ou NaCl +10% de DMSO). Os parâmetros hematológicos da série vermelha foram mensurados ao fim de 28 dias de investigação. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculados dos soros dos animais pertencentes aos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.4.2.2 - Série branca e plaquetária

O tratamento sub-crônico com os compostos SC-15 e GI-16 não ocasionou alteração dos níveis de leucócitos granulares, monócitos, segmentados, linfócitos, plaquetas e eosinófilos não diferiram estatisticamente entre os grupos estudados, apresentando valores semelhantes entre machos e fêmeas (Figura 24).

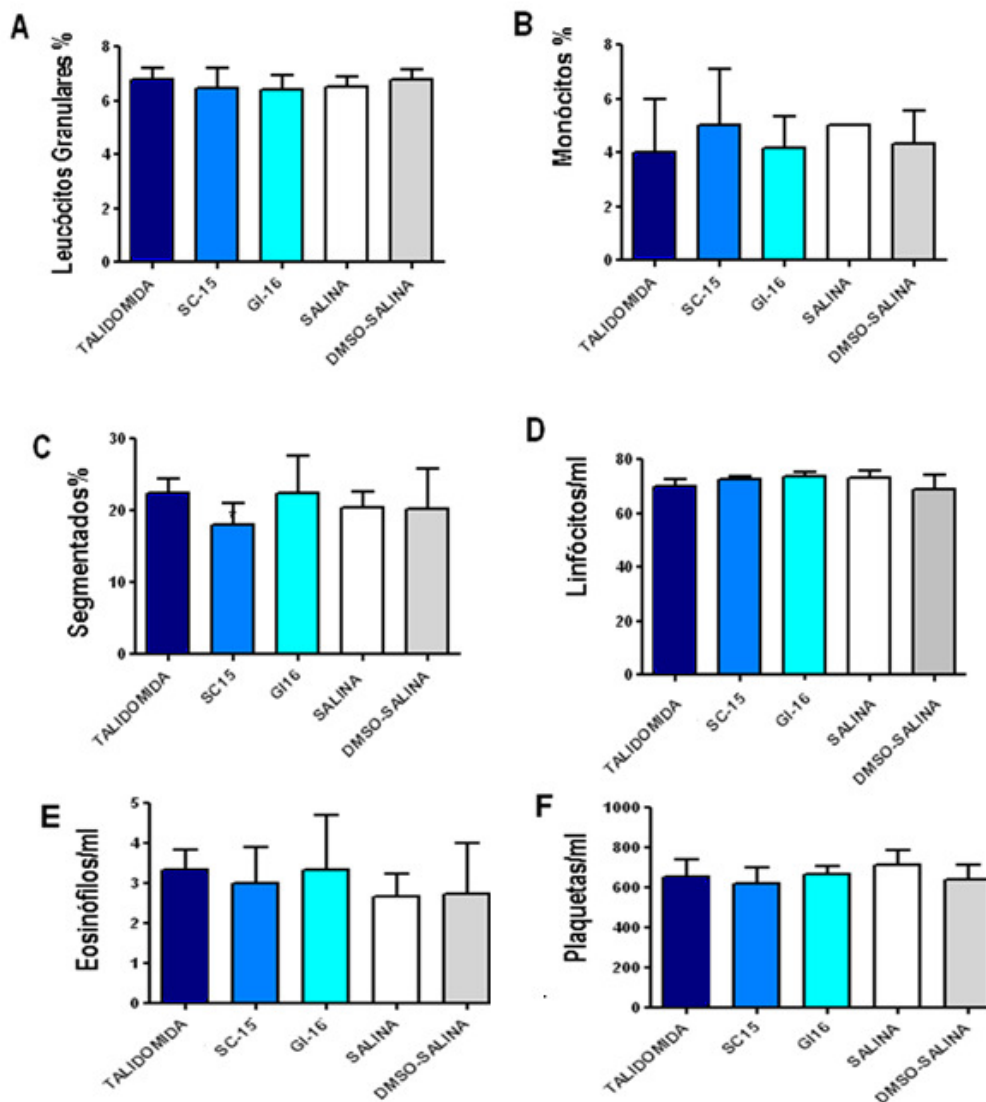


Figura 24. Teste de toxicidade sub-crônica. Número de leucócitos granulares (%) (A), monócitos (%) (B), segmentados (%) (C), linfócitos/ml (D), eosinófilos/ml (E) e plaquetas/ml (F). Ratos Wistar foram tratados a cada dois dias (20mg/kg, 0,8ml) com talidomida, SC-15, GI-16 ou soluções controle (0,8ml de NaCl 0,9% ou NaCl +10% de DMSO). O perfil hematológico das séries branca e plaquetária foi mensurado ao fim de 28 dias de investigação. As barras representam a média final e o desvio-padrão calculado do soro dos diferentes grupos testados através de ANOVA e teste Tukey.

#### 4.5 - Análise histopatológica do coração, fígado e rins

Como último parâmetro dos testes de toxicidade aguda e sub-crônica, realizaram-se as análises histopatológicas do coração, fígado e rins a fim de se verificar possíveis sinais de danos celulares em decorrência de ações tóxicas dos compostos SC-15 e GI-16. Fígado e rins são órgãos relacionados principalmente à metabolização de fármacos hidrossolúveis, enquanto o

coração é um órgão nobre, podendo ser um dos mais afetados quando ocorrem toxicidade e alterações bioquímicas e hematológicas (ANVISA, 1996).

#### **4.5.1- Coração:**

Nossos resultados demonstram que tanto os ratos pertencentes ao teste de toxicidade aguda quanto os pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica apresentaram endocárdio, miocárdio e pericárdio sem particularidades microscópicas; fibras musculares cardíacas (miocardiócitos) e vasos capilares preservados e ausência de danos celulares à microscopia óptica (Figura 25 e 26)

## CORAÇÃO

### TOXICIDADE AGUDA

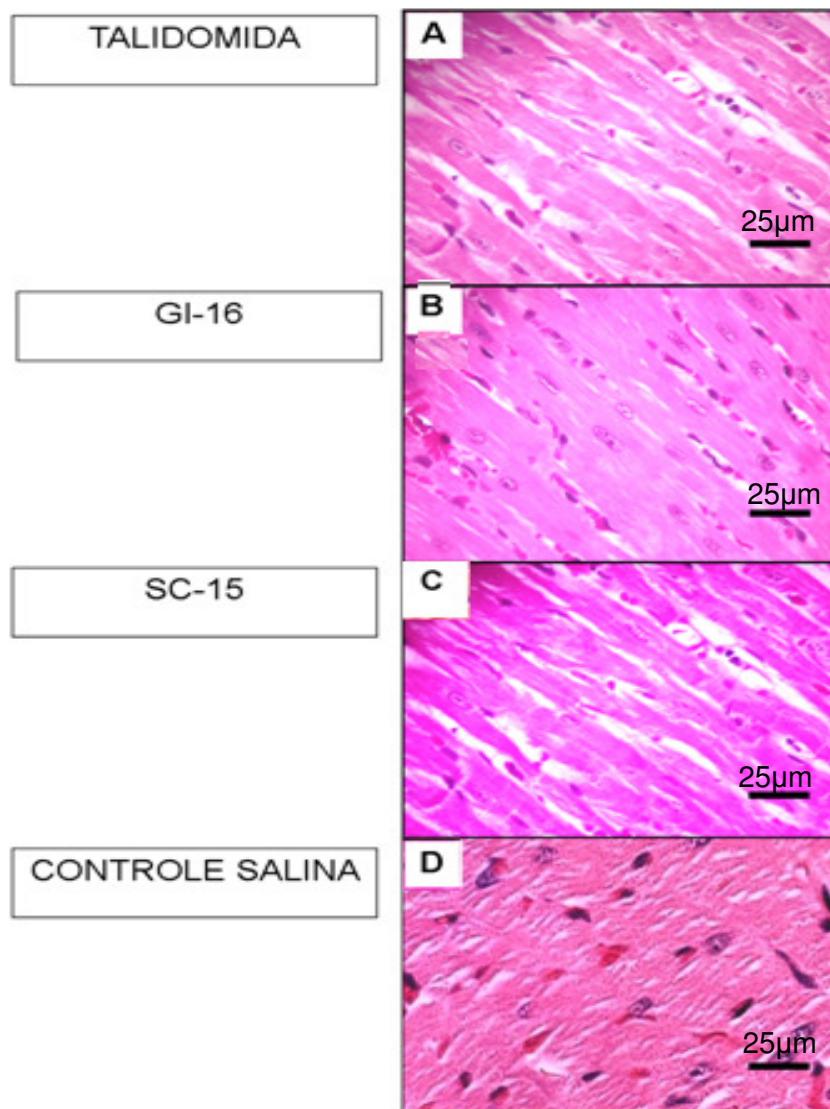


Figura 25. Teste de toxicidade aguda. Microscopia ótica de corte de tecido cardíaco. Ratos Wistar foram tratados com dose única (20mg/kg, 0,8ml) de talidomida (A), GI-16 (B), SC-15 (C). Grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml) (D). Após 14 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico em éter e extraiu-se o fígado para análise histopatológica através de microscopia ótica comum. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, aumento de 40x, escala de barra=25µm.

## CORAÇÃO

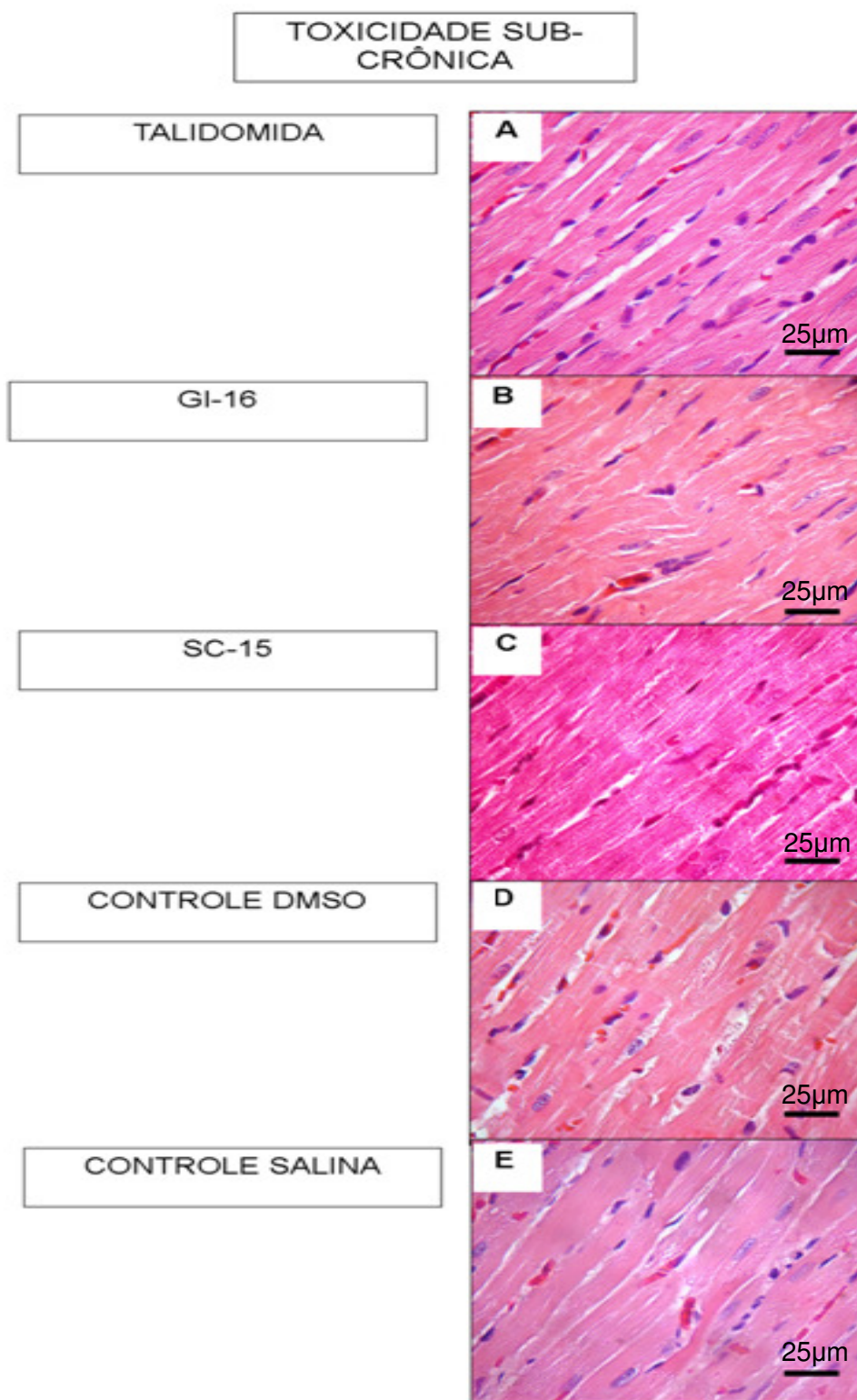


Figura 26. Teste de toxicidade sub-crônica. Microscopia ótica de corte de tecido cardíaco. Ratos Wistar foram tratados a cada dois dias (20mg/kg, 0,8ml) com talidomida (A), GI-16 (B), SC-15 (C). Grupos controle receberam solução de DMSO-salina (NaCl 0,9% + 10% de DMSO, 0,8ml) (D) ou solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml) (E). Após 28 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico em éter e extraiu-se o fígado para análise histopatológica através de microscopia ótica comum. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, aumento de 40x, escala de barra=25µm.

#### **4.5.2 -Fígado:**

Tanto os ratos pertencentes ao teste de toxicidade aguda quanto os pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica apresentaram trabéculas de hepatócitos adjacentes aos capilares sinusóides, assim como, células de Kupffer sem particularidades; veia centro lobular dentro dos limites da normalidade. Componentes do espaço porta (vênula, arteríola e ducto biliar) sem alterações (Figura 27 a 30).

## FÍGADO:VEIA CENTROLOBULAR

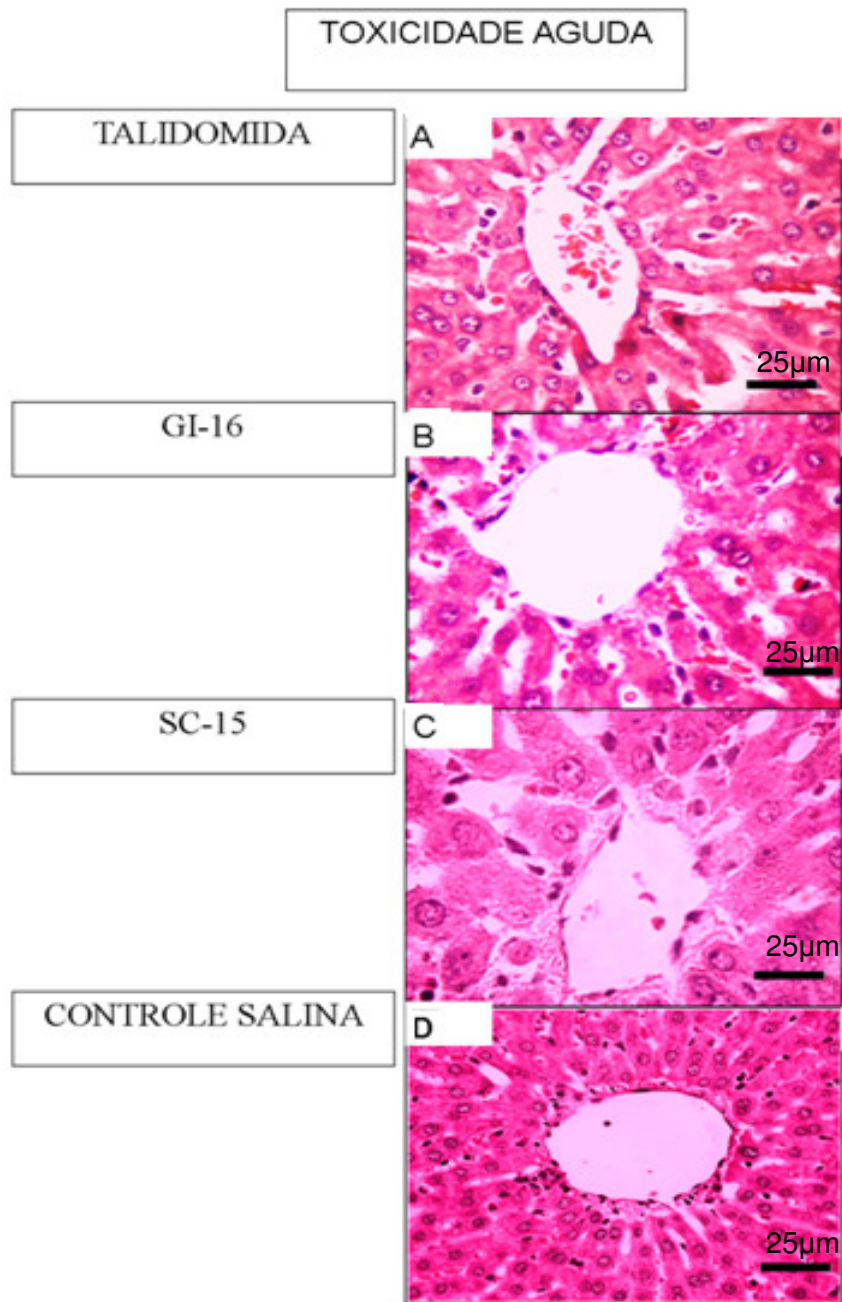


Figura 27. Teste de toxicidade aguda. Microscopia ótica de corte de tecido hepático (veia centrolobular). Ratos Wistar foram tratados com dose única (20mg/kg, 0,8ml) de talidomida (A), GI-16(B), SC-15 (C). Grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml) (D). Após 14 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico em éter e extraiu-se o fígado para análise histopatológica através de microscopia ótica comum. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, aumento de 40x, escala de barra=25µm..

## FÍGADO: VEIA CENTROLOBULAR

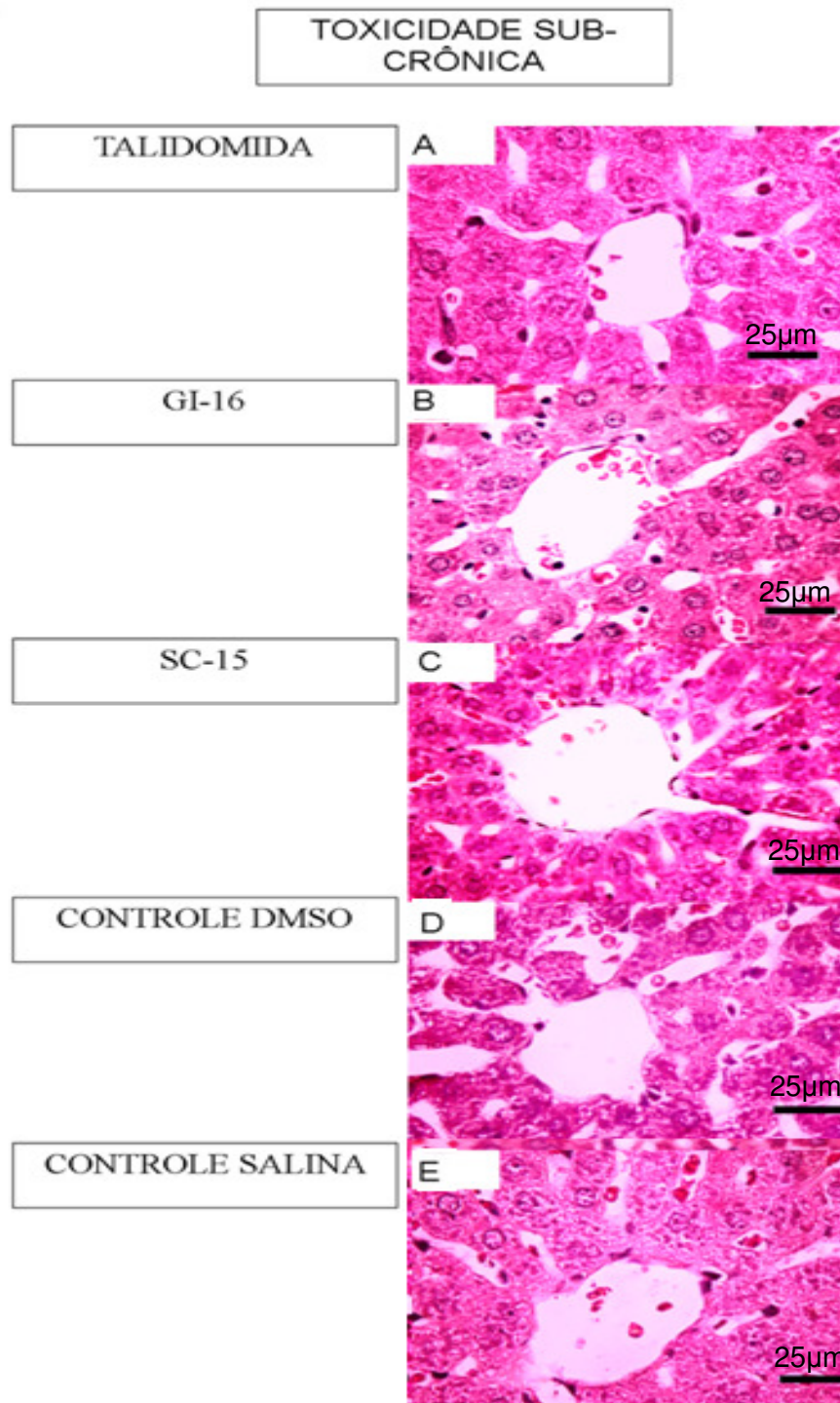


Figura 28. Teste de toxicidade sub-crônica. Microscopia ótica comum de corte de tecido hepático (veia centrolobular). Ratos Wistar foram tratados a cada dois dias (20mg/kg, 0,8ml) com talidomida (A), GI-16 (B), SC-15 (C). Grupos controle receberam solução de DMSO-salina (NaCl 0,9% + 10% de DMSO, 0,8ml) (D) ou solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml) (E). Após 28 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico em éter e extraiu-se o fígado para análise histopatológica através de microscopia ótica comum. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, aumento de 40x, escala de barra=25µm.



## FÍGADO: ESPAÇO-PORTA

### TOXICIDADE AGUDA

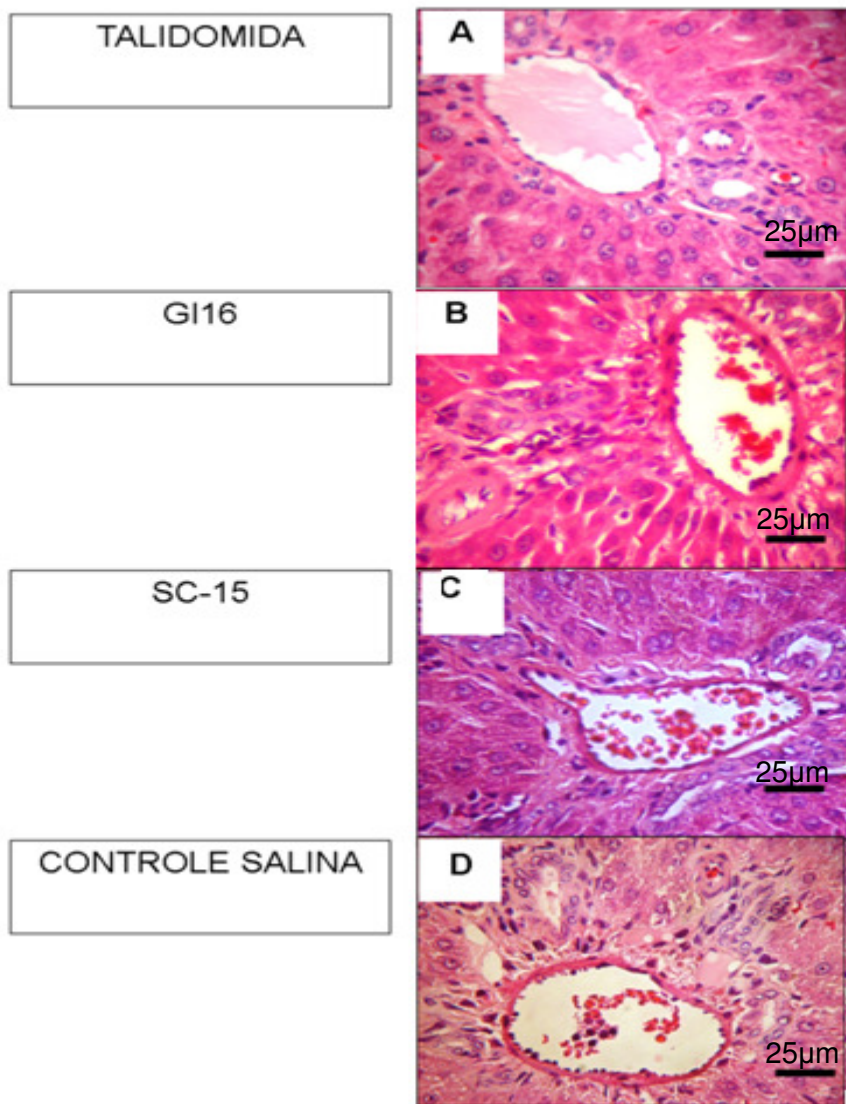


Figura 29. Teste de toxicidade aguda. Microscopia ótica comum de corte de tecido hepático (espaço-porta). Ratos Wistar foram tratados com dose única (20mg/kg, 0,8ml) de talidomida (A), GI-16 (B), SC-15 (C). Grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml) (D). Após 14 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico em éter e extraiu-se o fígado para análise histopatológica através de microscopia ótica comum. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, aumento de 40x, escala de barra=25µm.

## FÍGADO: ESPAÇO PORTA

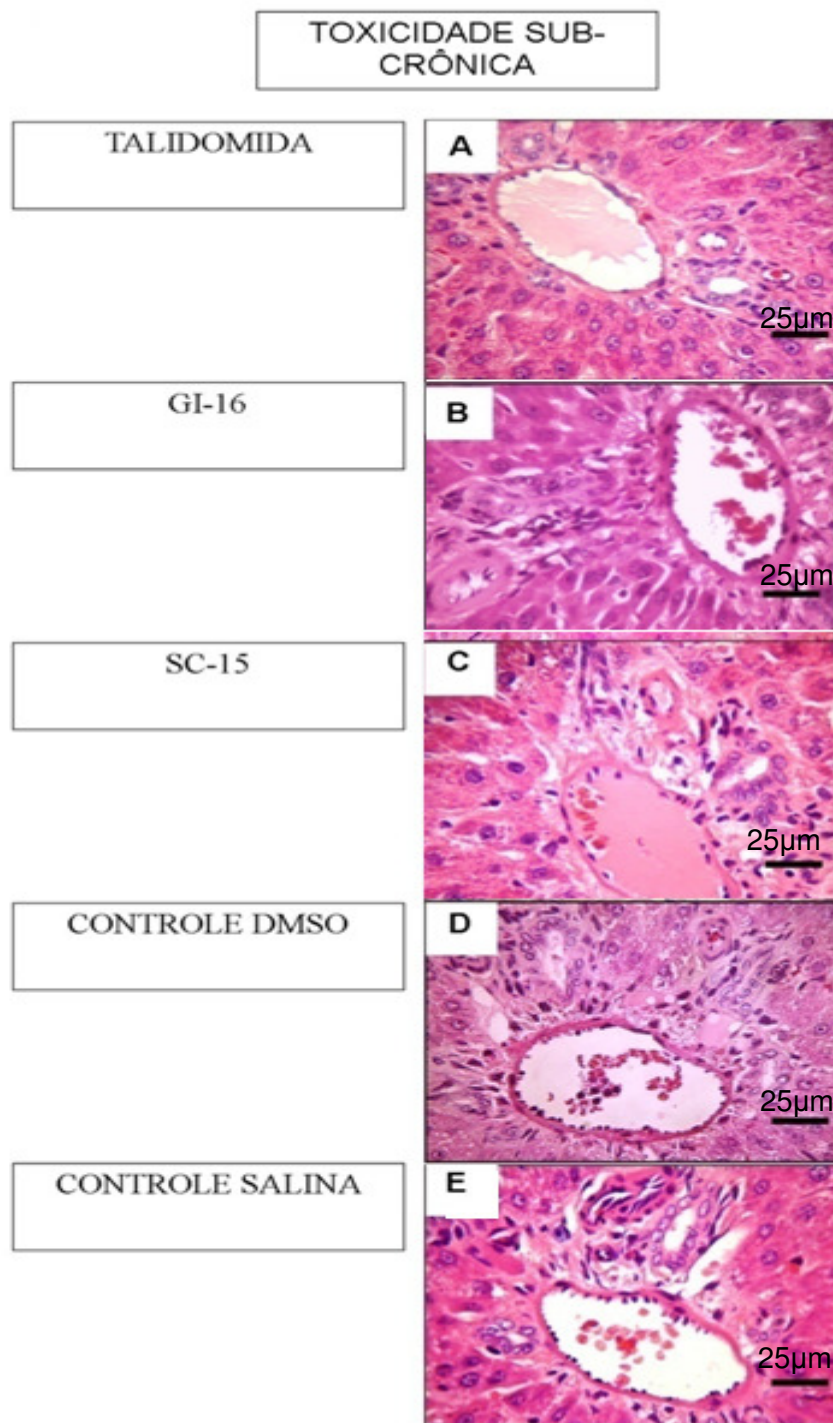


Figura 30. Teste de toxicidade sub-crônica. Microscopia ótica comum de corte de tecido hepático (espaço-porta). Ratos Wistar foram tratados a cada dois dias (20mg/kg, 0,8ml) com talidomida (A), GI-16 (B), SC-15 (C). Grupos controle receberam solução de DMSO-salina (NaCl 0,9% + 10% de DMSO, 0,8ml) (D) ou solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml) (E). Após 28 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico em éter e extraiu-se o fígado para análise histopatológica através de microscopia ótica comum. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, aumento de 40x, escala de barra=25µm.

### **4.5.3 -Rins**

Em relação aos rins, a análise histopatológica mostra que tanto os ratos pertencentes ao teste de toxicidade aguda quanto os pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica apresentaram resultados semelhantes. Foram observados túbulos contorcidos proximais e distais assim como interstício e componentes vasculares dentro dos limites da normalidade. Os componentes medulares: porções delgadas e espessas da alça de Henle, túbulos coletores, interstício e rede capilar peritubular não mostraram alterações. A cortex renal apresentou arquitetura preservada e corpúsculos renais dentro dos limites de normalidade (Figura 31 a 34).

## MEDULA RENAL

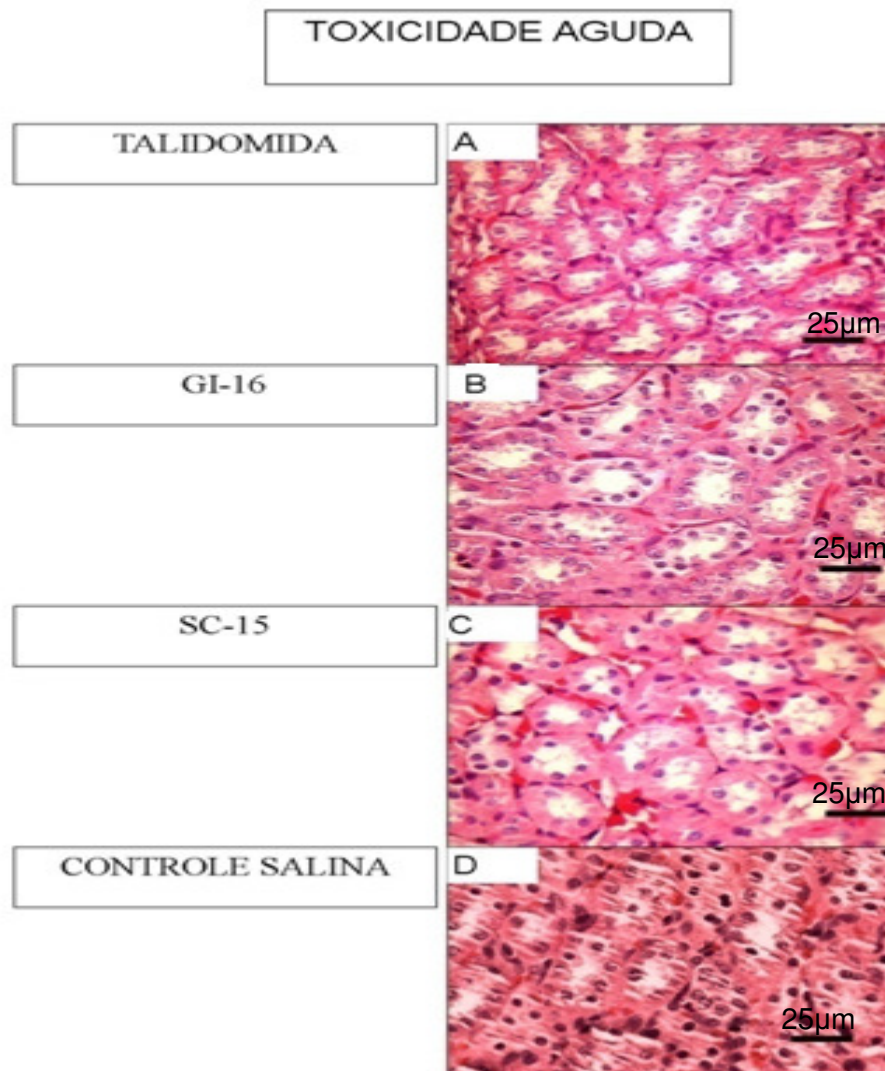


Figura 31. Teste de toxicidade aguda. Microscopia ótica de corte de tecido renal (medula). Ratos Wistar foram tratados com dose única (20mg/kg, 0,8ml) de talidomida (A), GI-16 (B), SC-15 (C). Grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml) (D). Após 14 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico em éter e extraiu-se o fígado para análise histopatológica através de microscopia ótica comum. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, aumento de 40x, escala de barra=25µm.

## MEDULA RENAL

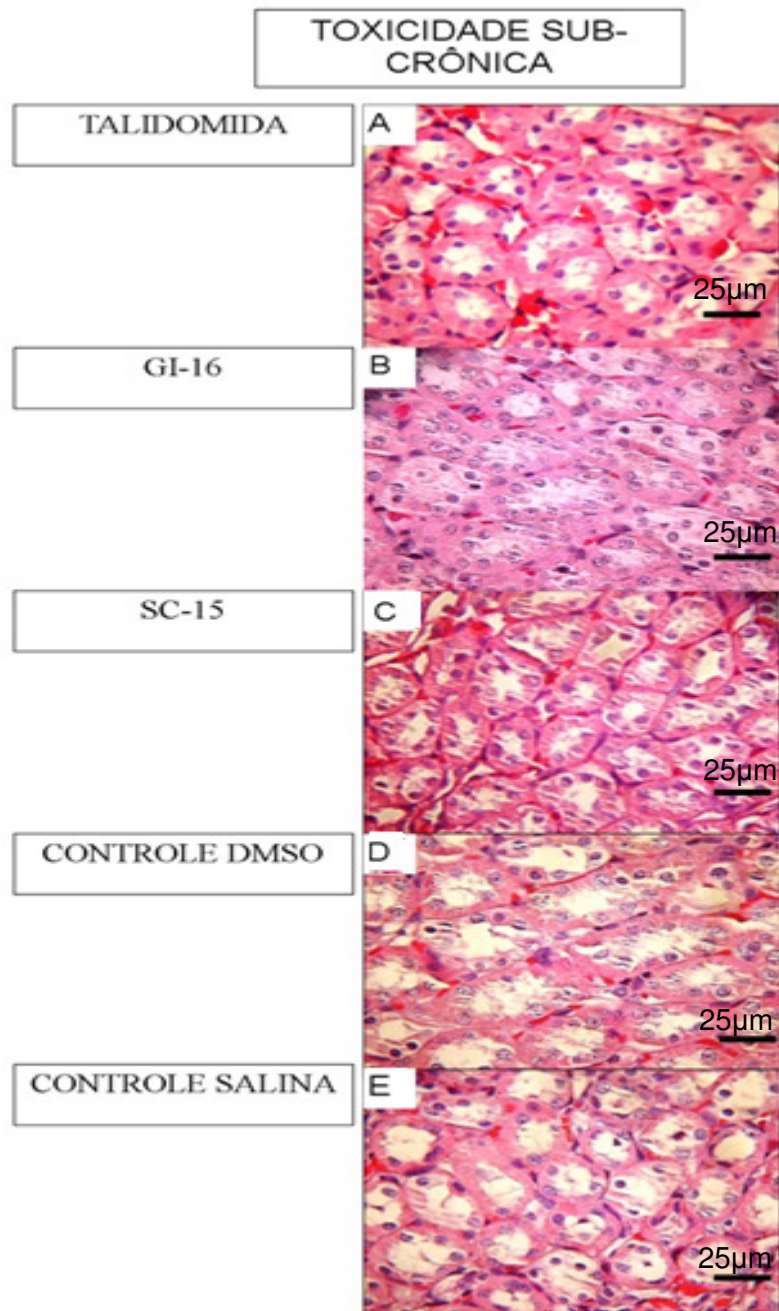


Figura 32. Teste de toxicidade sub-crônica. Microscopia ótica de corte de tecido renal (medula). Ratos Wistar foram tratados a cada dois dias (20mg/kg, 0,8ml) com talidomida (A), GI-16 (B), SC-15 (C). Grupos controle receberam solução de DMSO-salina (NaCl 0,9% + 10% de DMSO, 0,8ml) (D) ou solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml) (E). Após 28 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico em éter e extraiu-se o fígado para análise histopatológica através de microscopia ótica comum. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, aumento de 40x, escala de barra=25µm.

## CORTEX RENAL

### TOXICIDADE AGUDA

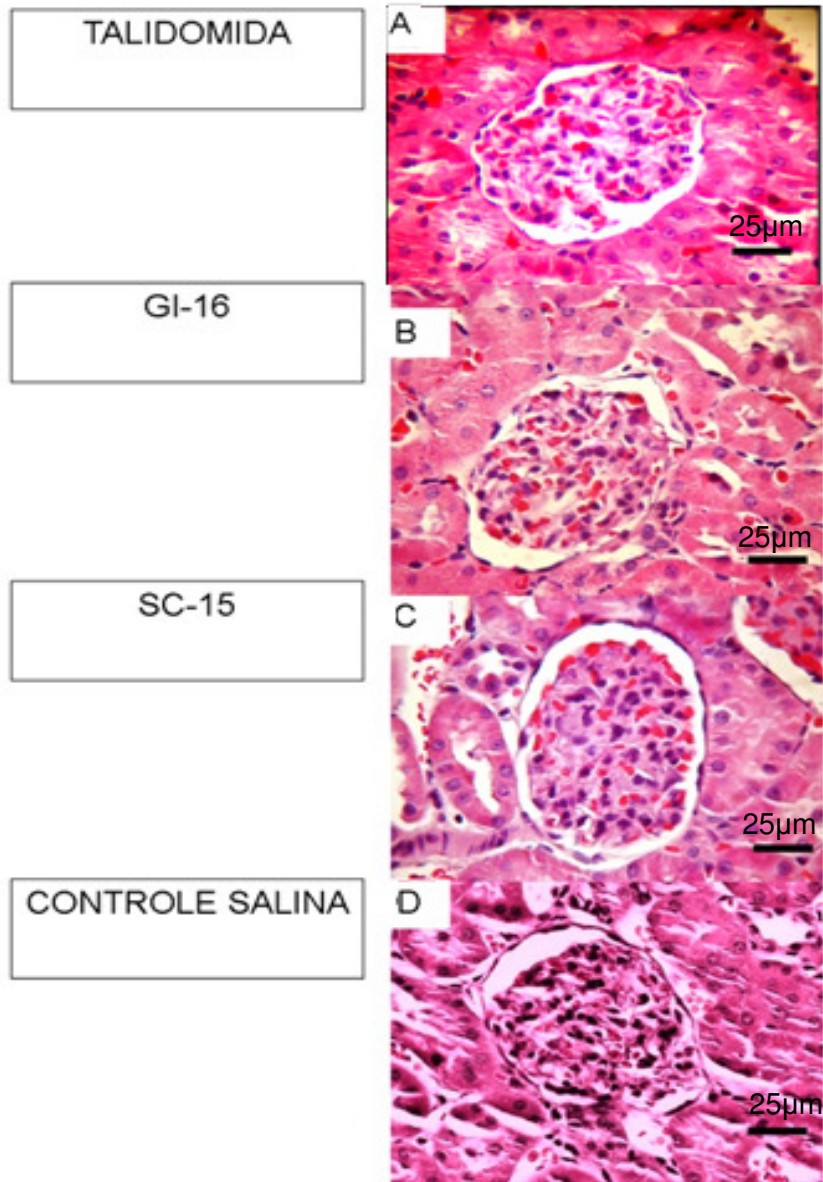


Figura 33. Teste de toxicidade aguda. Microscopia ótica de corte de tecido renal (cortex). Ratos Wistar foram tratados com dose única (20mg/kg, 0,8ml) de talidomida (A), GI-16 (B), SC-15 (C). Grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml) (D). Após 14 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico em éter e extraiu-se o fígado para análise histopatológica através de microscopia ótica comum. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, aumento de 40x, escala de barra=25µm..

## CORTEX RENAL

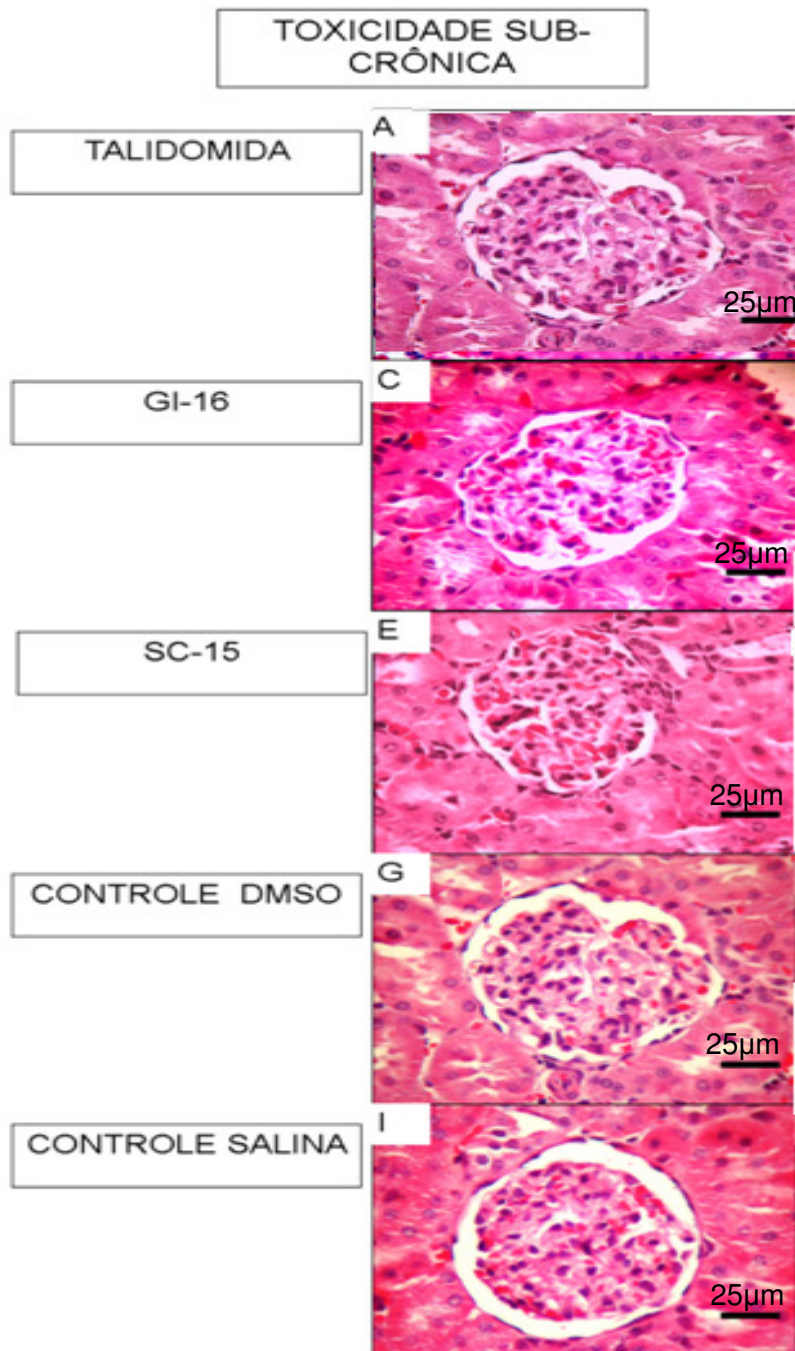


Figura 34. Teste de toxicidade sub-crônica. Microscopia ótica comum de corte de tecido renal (cortex). Ratos Wistar foram tratados a cada dois dias (20mg/kg, 0,8ml) com talidomida (A), GI-16 (B), SC-15 (C). Grupos controle receberam solução de DMSO-salina (NaCl 0,9% + 10% de DMSO, 0,8ml) (D) ou solução salina (NaCl 0,9%, 0,8ml) (E). Após 28 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico em éter e extraiu-se o fígado para análise histopatológica através de microscopia ótica comum. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, aumento de 40x, escala de barra=25µm..

## 5.- DISCUSSÃO

Desde sua inclusão no mercado, a talidomida mostrou-se útil para as mais diversas finalidades. Foi introduzida em 1953, sendo utilizada em sedações, controlando quadros de ansiedade, insônia, enjôos e indisposições matinais. Após alguns anos, as propriedades antiinflamatórias desta droga fizeram com que ela se mostrasse útil no tratamento de doenças graves como AIDS, câncer e doenças autoimunes (RAFIEE *et al.*, 2009). Mesmo diante de tantos benefícios, a sua teratogenicidade e efeitos neuropáticos fazem da talidomida um fármaco que ainda inspira cuidados, tendo, portanto, seu uso restrito a determinados grupos e casos (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Com o objetivo de contornar os efeitos adversos da talidomida e obter uma melhor eficácia no tratamento de distúrbios envolvendo inflamação exacerbada, diversos análogos deste composto têm sido desenvolvidos apresentando resultados cada vez mais animadores (MARRIOT *et al.*, 1998; CORRAL *et al.*, 1999). Neste trabalho foi investigada a atividade antiinflamatória *in vivo* e a toxicidade aguda e sub-crônica de dois análogos biftalimídicos hidrolizados abertos identificados como GI-16 e SC-15. Esses compostos diferem entre si em relação ao espaçamento entre os grupos ftalimídicos e presença de grupamento NO<sub>2</sub>. O composto GI-16 é o único que apresenta grupamentos NO<sub>2</sub>, além de ter 2 carbonos separando as cadeias ftalimídicas. Por outro lado, o composto SC-15 apresenta 3 carbonos separando as unidades ftalimídicas, além de não possuir grupamentos NO<sub>2</sub>. Como vantagem, a produção desses compostos é de baixo custo, são de grande hidrossolubilidade, o que facilita sua manipulação, e não apresentam o centro quiral associado à teratogenicidade.

Os resultados deste estudo mostram que: **1)** O tratamento com o composto GI-16 causou diminuição significativa do edema de pata induzido por carragenina a 2%, em comparação ao grupo controle salina, na dose de 10 mg/kg. Os compostos GI-16 e SC-15 controlaram o edema de pata induzido por carragenina de forma equivalente à talidomida e dexametasona, quando aplicados a 50mg/kg. **2)** Os compostos SC-15 e GI-16 reduziram significativamente a produção de TNF- $\alpha$  após a inflamação pulmonar induzida por inoculação intratraqueal de LPS. **3)** O composto GI-16 foi o único análogo



da talidomida que apresentou inibição significativa da produção de IL-6 quando usado a 20mg/kg. A 50mg/kg, tanto SC-15 quanto GI-16 ocasionaram alta inibição da produção de IL-6 em comparação ao grupo salina. 4) A produção de IL-10 foi aumentada após tratamento com SC-15, de forma semelhante ao observado após tratamento com talidomida, apenas na dosagem de 50mg/kg. 5) O tratamento com GI-16 reduziu de maneira acentuada a resposta inflamatória tecidual nos pulmões dos animais inoculados com LPS. O composto SC-15 exibiu redução considerável da inflamação pulmonar apenas a 50mg/kg. 6) Os testes de toxicidade aguda e sub-crônica demonstraram que os compostos SC-15 e GI-16 são desprovidos de ação tóxica, apresentando no teste de toxicidade sub-crônico apenas uma discreta redução do apetite e do consumo de água nos animais tratados com estes compostos.

#### **5.1-O tratamento com os compostos GI-16 e SC-15 causou diminuição significativa do edema de pata induzido por carragenina**

A carragenina faz parte da família de polissacarídeos lineares sulfatados derivados de algas marinhas vermelhas (rodófilas), sendo utilizada na indústria alimentícia na produção de sorvetes, balas e outros tipos de doces (TOBACMAN, 2001). Quando introduzida subcutaneamente, induz uma inflamação intensa no local aplicado caracterizado por edema, vermelhidão e dor. A carragenina também é constantemente associada a colites e úlceras em casos de ingestão excessiva dos alimentos dos quais este polissacarídeo faz parte (WATT e MARCUS, 1981; TOBACMAN, 2001). Neste trabalho, os compostos GI-16 e SC-15 inibiram significativamente o edema de pata induzido por carragenina. Esses resultados estão de acordo com outros estudos da área imunofarmacológica, que usaram o modelo de inflamação de pata induzido por carragenina como prova da capacidade antiinflamatória de diversos medicamentos, como sedativos, analgésicos, antipiréticos, entre outros (ZHOU *et al.*, 2008). Segundo Rocha e colaboradores (2006), o edema de pata induzido por inoculação subcutânea de carragenina está correlacionado com a produção de diversos mediadores inflamatórios como a histamina, prostaglandinas, quininas, óxido nítrico e citocinas como o TNF- $\alpha$ .

Os benefícios em controlar estes mediadores em modelos de edema de pata são demonstrados por Castardo e colaboradores (2008), onde se avaliaram as propriedades antiinflamatórias de extratos hidroalcoólicos da planta *Garcinia gardneriana*, em que se verificou redução do edema bem como de seus agentes causadores, caracterizando-se por baixa atividade neutrofílica e reduzida liberação de histamina e prostaglandinas. Pesquisas com outros compostos antiinflamatórios como a palmitoetanolamida, um ácido graxo da família da etanolamida, são exemplo de outro fármaco que atua como analgésico e antiinflamatório, controlando o edema induzido por carragenina em camundongos através do controle da expressão do receptor proliferador de peroximoma ativado (PPAR), um fator de transcrição responsável pela liberação de moléculas pró-inflamatórias, como cicloxigenases e óxido nítrico sintetases (D'AGOSTINO *et al.*, 2007). Adicionalmente, outros trabalhos também relatam que a capacidade da talidomida e de seus análogos em controlar estes mediadores, em especial o TNF- $\alpha$ , também contribuem para o controle da reação inflamatória desencadeada por carragenina. (ROCHA *et al.*, 2006). Estudo feito por Collin e colaboradores (2001), testou análogos da talidomida da série dos N-piridinil(alquil)ftalimidas, onde foi percebida significativa inibição sobre a produção de TNF- $\alpha$  e reduzido edema no modelo de inflamação de pata com carragenina em ratos. Falcão e colaboradores (2006), também obtiveram resultados semelhantes testando análogos da talidomida da série de derivados ftalimídicos, reforçando os resultados obtidos em nosso estudo.

## **5.2- Modulação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 no pulmões de camundongos tratados *in vivo* com os compostos GI-16 e SC-15 e estimulados com LPS.**

O LPS é conhecido como uma potente endotoxina sendo responsável por alta reação inflamatória caracterizada por grande liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6, ocasionando recrutamento intenso de diversas células do sistema imune, principalmente neutrófilos e macrófagos podendo, inclusive, ocasionar choque séptico em infecções severas (RAETZ e WHITFIELD, 2002).

Almeida e colaboradores (2007) relataram pela primeira vez, que análogos da talidomida apresentando duas subunidades ftalimídicas contendo diaminas, tinham capacidade de inibição sobre TNF- $\alpha$ . Mazzoccoli e colaboradores (2012), reforçam os dados de Almeida. Os autores ainda constataram que análogos da talidomida que apresentam na sua composição duas unidades ftalimídicas abertas separadas por diaminas contendo ou não o grupo NO<sub>2</sub> na sua estrutura tem a capacidade de inibir marcadamente a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos J774A1 e também por PBMC humano após estímulo com LPS. O presente trabalho reforça esses dados anteriores, mostrando agora que a inibição sobre TNF- $\alpha$  também ocorre *in vivo*. A produção de TNF- $\alpha$  nos animais tratados com SC-15 ou GI-16 e estimulados com LPS foi 34% menor em comparação ao grupo controle tratado com salina. Dados semelhantes foram obtidos no estudo de Lima e colaboradores (2002), onde os compostos derivados da talidomida, *N*-fenil-ftalimidassulfonamida e os isosters *N*-fenil-ftalimida amidas, reduziram o recrutamento de neutrófilos em decorrência da inibição de TNF- $\alpha$ .

Foi descrito, por diferentes autores, que análogos da talidomida apresentam grande capacidade em controlar a produção de IL-6 (CALIGARIS-CAPPIO *et al.*, 1991; MAZZOCCOLI *et al.*, 2012; ). A lenalidomida, por exemplo, é utilizada no tratamento do mieloma, exibindo resultados promissores no controle da IL-6, tendo eficácia inclusive em pacientes refratários aos tratamentos convencionais (JEANNY *et al.*, 2007). Neste estudo, os compostos SC-15 e GI-16 apresentaram significativa atividade inibitória sobre a produção de IL-6 em relação ao grupo controle. Destaque especial para o composto GI-16, que diferentemente de SC-15, conteve esta citocina em ambas dosagens adotadas.

Apesar da diferença de produção de TNF- $\alpha$  em ambas as doses usadas, e de IL-6 na dose de 50mg/kg, não ser estatisticamente diferente no homogenato dos animais tratados com os compostos SC-15 ou GI-16, o fármaco SC-15 demonstrou tendência em ser mais eficiente apenas quando usado a 50mg/kg e em ser inferior a GI-16 em controlar TNF- $\alpha$  e IL-6. Os mecanismos que regulam a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 ainda serão investigados e podem envolver: 1) inibição da ativação do NF- $\kappa$ B (KEIFER *et*

*al.*, 2001), 2) a indução de apoptose (HIDESHIMA *et al.*, 2000), 3) eventos envolvendo inibição da produção de PDE-4 (MULLER *et al.*, 1998), 4) ligação a alfa 1-glicoproteína ácida com alta especificidade (TURK, JIANG e LIU, 1996), 4) mecanismos que envolvem a regulação de mRNA (MOREIRA *et al.*, 1993).

A diferença de eficácia entre GI-16 e SC-15 em controlar citocinas inflamatórias pode ser explicada pelas suas configurações estruturais. GI-16 e SC-15 são quimicamente semelhantes, exceto pelo fato de que GI-16 possui o grupamento NO<sub>2</sub> em sua composição. Conforme relatado anteriormente por Mazzoccoli e colaboradores (2012), compostos contendo unidades ftalimídicas abertas, separadas por diaminas e com presença do grupamento NO<sub>2</sub> na sua estrutura, demonstram maior poder em conter a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias em PBMC humanos e células J774 em comparação a compostos desprovidos deste grupamento. Foi sugerido que a adição de NO<sub>2</sub> resulta em metabólitos amínicos adicionais que contribuiriam para uma maior ação antiinflamatória. Segundo este mesmo estudo, ao testar a capacidade de inibição inflamatória de análogos da talidomidabiftalimídiocos, contendo diaminas, possuindo ou não o grupamento NO<sub>2</sub>, utilizando como modelo células J774 estimuladas com LPS, constatou-se que a ação inibidora destes fármacos sobre a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IFN- $\gamma$  correlaciona com inibição do acúmulo de mRNA em culturas de 6 horas, resultando em menos transcrição gênica destas moléculas (MAZZOCCOLI *et al.*, 2012). Além disso, outros estudos já demonstravam que o potencial antiinflamatório da talidomida se deve a intervenção nas vias de sinalização NF- $\kappa$ B dependentes e inserção entre as bases do DNA entre outros mecanismos que resultam em redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias e diminuição da expressão de moléculas de adesão e inibição da angiogênese (RAFIEE *et al.* 2009).

Um dos eventos pós-transcricionais sobre os mRNAs de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IFN- $\gamma$  foi demonstrado por Jin e colaboradores (2007), onde a talidomida inibiu o deslocamento citoplasmático de HuR, que está envolvido na estabilização de proteínas e da proteína MAPK-p38, que relaciona-se com a regulação pós-transcricional da estabilidade do mRNA para COX-2 além de TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e iNOS. Assim, GI-16 e SC-15 poderiam agir de maneira semelhante, explicando suas formas de agir sobre a síntese protéica e

produção de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e outros componentes inflamatórios.

O composto SC-15 foi o único, juntamente com a talidomida, a ser capaz de elevar a produção de IL-10, embora apenas quando usados a 50mg/kg. Corral e colaboradores (1996) demonstraram que análogos ftalimídicos, utilizados em culturas de células mononucleares de sangue periférico humano estimuladas com LPS, induziram aumento da produção de IL-10. Os autores também demonstraram que o tratamento das culturas com anti-IL-10 não causava alteração do efeito inibitório dos compostos sobre a produção de TNF- $\alpha$ , indicando que a inibição para produção de TNF- $\alpha$  era mesmo mediada pelos compostos e não pela ação da IL-10. Outros estudos, no entanto, mostraram que o tratamento com talidomida resultou em redução da produção de mRNA para IL-10 em biópsia de tecido epitelial de pacientes com ENL e em pulmões de camundongos infectados com *M. tuberculosis* (MOREIRA *et al.*, 1997). Em contraste, Rowland e colaboradores (1998) mostraram que em PBMCs humanas estimuladas com PHA por 9 horas tratadas com talidomida não apresentavam efeito significativo no acúmulo de mRNA para IL-10 bem como na produção de IL-10 avaliada no sobrenadante após 48 horas de cultura. Nossos resultados foram concordantes com estes estudos, pois a elevação de IL-10 vista no tratamento com 50mg/kg de SC-15 ou talidomida sugere que a modulação da produção de IL-10 pode também estar envolvida no controle da resposta inflamatória. Por outro lado, esta modulação depende do tipo de análogo em questão, do estímulo usado, das células envolvidas e da dosagem dos análogos, podendo isto justificar, em parte, as diferenças na liberação de IL-10 entre SC-15 e GI-16.

### **5.3- Os compostos GI-16 e SC-15 reduziram a resposta inflamatória tecidual nos pulmões dos animais inoculados com LPS.**

Análises histopatológicas dos pulmões dos animais tratados com GI-16 e SC-15 e estimulados com LPS foram realizadas para avaliar a correlação entre a produção de citocinas e a resposta inflamatória local. Os resultados do presente trabalho mostram que o tratamento com GI-16, nas duas doses

utilizadas, causou redução de citocinas pró-inflamatórias e resultou em leve infiltrado inflamatório e discreta congestão vascular após estimulação com LPS. Por outro lado, o composto SC-15 reduziu a inflamação local apenas a 50mg/kg. Em concordância com os nossos resultados, estudo feito por Ye e colaboradores (2006) demonstrou que o tratamento com talidomida ocasiona redução de citocinas pró-inflamatórias e favorece o controle do infiltrado inflamatório pulmonar, levando a uma melhora clínica de pacientes com sarcoidose, pneumonia hipersensível e fibrose pulmonar idiopática. Também de acordo com nossos resultados, Machado e colaboradores (2005), mostraram que o tratamento com os análogos da talidomida da série dos derivativos 2-fenoxi-ftalimida, apresentando diversos substituintes no radical fenil-ftalimida, ocasionou cerca de 60% de redução do influxo neutrofílico e dos níveis de TNF- $\alpha$  nos pulmões de camundongos estimulados com LPS pela via nasal.

A falha do tratamento com SC-15 em controlar a inflamação nos pulmões, quando usada a 20mg/kg pode estar relacionada com os altos níveis de IL-6 detectados nos homogenatos de pulmão. Em favor disso, foi descrito que uma alta produção de IL-6, aliado à produção aumentada de IL-1, IL-17, IL-8, favorece o recrutamento e a ativação de macrófagos e neutrófilos que ocasionam inflamação e danos teciduais (BETELLI *et al.* 2006). O aumento da dose de SC-15 para 50mg/kg causou redução da produção de IL-6 e aumentou os níveis de IL-10, além de manter reduzida a produção de TNF- $\alpha$ , podendo isto justificar, em parte, a redução do infiltrado inflamatório nos pulmões quando se aumentou a dose de SC-15. Outra provável razão das diferenças histopatológicas entre os pulmões dos animais tratados com SC-15 ou GI-16 pode ser relacionada ao fato de que apenas o composto GI-16 ser capaz de reduzir significativamente os níveis de outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IFN- $\gamma$  e IL-17, o que merece futura investigação.

#### **5.4- Avaliação da toxicidade aguda e sub-crônica dos compostos SC-15 e GI-16.**

O uso de determinados fármacos pode causar, imediatamente ou em longo prazo, alterações metabólicas, bioquímicas e hematológicas que podem

ocasionar prejuízos à saúde de seus usuários, podendo isso comprometer sua aplicabilidade (DALL'AGNOL, 2004). O cortisol, por exemplo, é um hormônio natural utilizado para tratar casos de inflamação crônica, devido a sua capacidade em reduzir a expressão de moléculas de adesão, diminuir a fagocitose e o nível de linfócitos T circulantes além de interferir em vias sinalizadoras (BUENO *et al.*, 2011). Entretanto, o uso do cortisol pode ocasionar desequilíbrio glicêmico e lipídico por ocasionar aumento da liberação de glicose hepática no sangue, elevar o apetite, que por sua vez, interfere no metabolismo lipídico aumentando a lipogênese (BUENO *et al.*, 2011). A ciclosporina é outro exemplo de uma potente droga imunossupressora, utilizada para evitar rejeições em transplantes, atuando como um inibidor de IL-2, reduzindo a produção e atividade de linfócitos T podendo acarretar propensão a infecções (WINKLER, 1992). Além disso, a própria talidomida pode apresentar efeitos adversos como redução leucocitária, sonolência, aumento do apetite e alterações da taxa metabólica refletindo-se em modificações no metabolismo de glicose e gorduras (PERRI III e SYLVIA, 2003). Portanto, o grau de toxicidade de um fármaco deve ser cuidadosamente avaliado para se determinar quais os riscos que esse tratamento pode oferecer, bem como definir qual a população alvo a ser atingida.

Neste estudo, os fármacos SC-15 e GI-16 foram submetidos ao teste de toxicidade aguda e sub-crônica em ratos Wistar, machos e fêmeos, a fim de verificar possíveis alterações metabólicas, comportamentais, bioquímicas, hematológicas e histopatológicas decorrentes do uso destes compostos. Os resultados obtidos mostram que o tratamento em dose única, ou em dias alternados, com os compostos SC-15 ou GI-16, não induziu qualquer sinal clínico de toxicidade, imediatamente ou durante os tratamentos. O tratamento usado não causou morbidade ou mortalidade dos animais tratados. Além disso, não foram detectadas alterações bioquímicas ou hematológicas significativas com o uso destes fármacos. Nenhum dos compostos induziu danos, infiltrados, ou quaisquer outras alterações celulares no coração, fígado e rins dos animais testados.

Pesquisas anteriores já vinham mostrando a baixa incidência de toxicidade e efeitos adversos desencadeados pelo tratamento com análogos da talidomida. Segundo Jeanny e colaboradores (2007), análogos como a

lenalidomida e actimida, possuem alta capacidade de suprimir citocinas inflamatórias e excelente ação antiangiogênica, o que justifica sua alta eficácia no tratamento de cânceres e doenças autoimunes graves como artrite reumatóide. Esses compostos mostraram ser bem tolerados por seus usuários, com incidência inferior de sonolência e neuropatias em comparação à talidomida, apresentando em raros casos (menos de 12,5%) mielossupressão em pacientes idosos com mais de 4 meses de tratamento. Reforçando os dados fornecidos por Jeanny e colaboradores (2007), Sharma e colaboradores (2006), avaliando pacientes portadores de tumores sólidos e refratários aos tratamentos convencionais, analisaram os efeitos pré-clínicos da lenalidomida. O estudo constatou a reconhecida eficácia antitumoral deste composto e que a ingestão diária de cápsulas de lenalidomida nas doses de 10 a 150mg ocasionou hipersensibilidade de grau 3, neutropenia de grau 3 a 4 e arritmia cardíaca em apenas 6 pacientes dentre 26 estudados. Geyer e colaboradores (2011) também relatam que o tratamento com pomalidomida, um outro análogo da talidomida, correlacionou-se com toxicidade pulmonar, caracterizada por dispnéia, hipoxia e febre, sem causa infecciosa somente em 2 pacientes investigados. Estes estudos, portanto, demonstram que os análogos da talidomida apresentam reconhecida eficácia e efeitos adversos em raras ocasiões. Nossos resultados foram concordantes aos obtidos por outros autores (SHARMA *et al.*, 2006; JEANNY *et al.*, 2007), tendo como vantagem adicional, a ausência de alteração leucocitária e de outros distúrbios hematológicos ou bioquímicos, mesmo quando os compostos SC-15 e GI-16 foram ministrados em dias alternados.

Quanto ao consumo de água e alimentos, e ganho de peso, estudos anteriores relatam que a talidomida pode ocasionar aumento do apetite e do peso corporal, entretanto não se sabe se essa droga afeta diretamente o consumo hídrico (AHFS, 2002; DRUGDEX, 2003; WU e HUANG, 2005). Por outro lado, foi descrito que o tratamento com lenalidomida e a pomalidomida pode ocasionar perda do apetite e diminuição do consumo de água em camundongos e coelhos (MULDUR, 2012; [www.drugs.com](http://www.drugs.com)). Foi sugerido que o aumento do apetite e do peso dos animais tratados com talidomida está relacionado à capacidade da talidomida induzir sonolência (WU e HUANG., 2005). Diversos trabalhos mostram que o aumento da sonolência ocasiona



queda nos níveis de leptina e elevação dos níveis da grelina. Este desequilíbrio reduz a saciedade e aumenta a sensação de fome. O aumento do apetite associado ao menor desejo de se exercitar em decorrência do sono pode elevar o peso de indivíduos que fazem uso da talidomida (VAN CAUTER *et al.*, 2007).

Os resultados deste estudo mostram que, apesar dos tratamentos testados não alteraram significativamente o peso dos animais, nos ratos machos o tratamento sub-crônico com a talidomida, ou com os compostos GI-16 e SC-15, causou leve redução do consumo de ração e água. Esta redução do apetite não foi observada nas fêmeas tratadas. Essa diferença de consumo de ração pode ser devido à natural diferença fisiológica e hormonal observada entre machos e fêmeas (CORTRIGHT *et al.*, 1997). Os autores relatam que a testosterona ocasiona aumento do gasto energético e da sensação de fome. Uma vez que ratos machos produzem testosterona em maior grau, é natural que ratos machos tenham um apetite e consumam mais ração e água se comparados às fêmeas. Em relação ao consumo hídrico, as fêmeas mostraram uma leve redução no consumo de água, apenas após o tratamento com talidomida e GI-16. Desta forma, análogos da talidomida, devido a sua grande diversidade estrutural, podem agir de maneira diferente sobre o apetite e consumo de água, mas não detectamos diferenças significativas no ganho de peso, o que reforça a não toxicidade desses compostos.

A teratogenicidade é o efeito adverso mais severo associado ao uso da talidomida. A ingestão média de 100mg deste composto entre 20 e 40 dias pode resultar em graves deformidades como focomelia, hipoplasia medular, falhas na geração do tubo neural, alterações ósseas entre outras malformações (FAVER *et al.*, 2004). Os grupos ftalimídicos intactos estão associados à teratogenicidade, que geralmente é decorrente da baixa formação vascular e inibição de enzimas como a proteína cereblon, responsável pelo desenvolvimento dos membros fetais nos dois primeiros meses de gestação (FAVER *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2010; LOPEZ-GIRONA *et al.*, 2012). Segundo Ito e colaboradores (2010), a cereblon forma um complexo ubiquitina E3 ligase com duas proteínas chamadas de ligadora associada ao dano de DNA tipo I e Cul4A. Este complexo é importante para o crescimento e atividade dos

fibroblastos e conseqüente desenvolvimento fetal. A talidomida liga-se à cereblon e impede a formação do complexo resultando em deficiência do desenvolvimento fetal (ITO *et al.*,2010). Desta forma a talidomida é desaconselhada para mulheres em período gestacional ou que desejam ter filhos. Os análogos de talidomida também tem por finalidade a prevenção ou redução dos índices de teratogênese (MARRIOT *et al.*, 1998; CORRAL *et al.*, 1999). Uma vez que análogos de talidomida são gerados em decorrência de diferentes modificações em sua estrutura, diversas pesquisas divergem quanto à teratogenicidade dos compostos derivados deste fármaco (SCHMAHI *et al.*, 1988; ). Segundo Schmahi e colaboradores (1988), apenas um S-enantiomêro (EM 12) da talidomida assim como seus metabólitos, foi capaz de gerar malformações em camundongos e ratos, modelos usualmente resistentes a malformações por talidomida. No entanto, segundo este mesmo estudo, nenhum sinal de atividade teratogênica foi evidenciada em coelhos (modelo geralmente susceptível à ação teratogênica da talidomida). Desta maneira, sugere-se que a teratogenicidade decorrente do uso de talidomida depende, além da espécie envolvida, e das propriedades do fármaco. Outros compostos como a lenalidomida e a pomalidomida também exerceram ação teratogênica em zebrafish e células humanas por inibir a proteína cereblon (ZHU *et al.*, 2011; LOPEZ-GIRONA *et al.*,2012). Por outro lado, Gordon e colaboradores, 1980, relataram dois análogos da talidomida denominados ftalimida e hexahidrotalidomida, que se mostraram atóxicos e não teratogênicos em diversos modelos animais.Parman e colaboradores (1999) e Campos e colaboradores (2006), descreveram que análogos da talidomida que apresentam remoção do centro quiral teratogênico, apresentam ocorrência reduzida de teratogenicidade. Desta forma,apesar da ausência de toxicidade, eficácia antiinflamatória e remoção do centro quiral teratogênico, estudos posteriores são necessários para se verificar se os compostos GI-16 e SC-15 realmente estão livres da ação sobre malformações fetais. Apesar disso, de um modo geral, os resultados obtidos neste trabalho já são bastante animadores, contribuindo para o avanço das pesquisas científicas com drogas antiinflamatórias derivadas da talidomida.

## 6.- CONCLUSÕES

6.1) Os compostos GI-16 e SC-15 controlaram significativamente o edema de pata induzido por inoculação subcutânea com carragenina 2% em camundongos BalB/c.

6.2) Os compostos GI-16 e SC-15 controlaram significativamente a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 induzida pela inflamação pulmonar através da inoculação intratraqueal de LPS em camundongos C57Bl/6

6.3) O composto SC-15 foi o análogo da talidomida a elevar significativamente os níveis de IL-10 após estímulo com LPS , embora apenas quando foi utilizado na dose de 50mg/kg

6.4) O composto GI-16 demonstrou melhor ação que SC-15 em controlar o edema de pata induzido por carragenina e a inflamação pulmonar induzida por LPS, mesmo nas menores dosagens.

6.5) Os testes de toxicidade aguda e sub-crônica mostram que os compostos SC-15 e GI-16 exibem baixa toxicidade, não apresentando alterações histopatológicas, bioquímicas e hematológicas consideráveis.

6.7) GI-16 e SC-15 apresentam-se como drogas promissoras no controle de quadros inflamatórios crônicos e outras desordens, contribuindo para uma boa aceitação de análogos poliamínicos ftalimídicos hidrolizados.

## 7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, C.; MENEGHIN, A.; SEMENZATO, G. 2002. T-lymphocytes and cytokines in sarcoidosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, **8 (5)**: 435-440.

AHFS Drug Information, 2002.ASHP.

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

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 116/MS/SNVS, de 8 de agosto de 1996. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/116\\_96.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/116_96.htm)>. Acesso em: 19 de ABRIL de 2013.

BAUDITZ, J.; WEDEL, S.; LOCHS, H. 2002. Thalidomide reduces tumour necrosis factor alpha and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. **Gut**, **50**: 196-200.

BAUER, K.S.; DIXON, S.C.; FIGG, W.D. 1998. Inhibition of Angiogenesis by Thalidomide requires metabolic activation, which is species-dependent. **Biochemical Pharmacology**, **55(11)**: 1827-1834.

BASÍLIO, F.M.A; HAMMERSCHMIDT, M; MUKAI, M.M; WERNER, B; PINHEIRO, R.L; MORITZ, S. 2012. Mucormycosis and chromoblastomycosis occurring in a patient with leprosy type 2 reaction under prolonged corticosteroid and thalidomide therapy. **An.Bras.Dermatol**, **vol.87** nº5.

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

BETELLI E; CARRIER Y; GAO W; KORN T; STROM T B; OUKKA M; WEINER H L; KUCHROO V K. 2006. Reciprocal developmental pathways for

regulation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. **Naure** **441**, 235-238.

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

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

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

BUENO, J R; GOUVÊA, C M C P. 2011. Cortisol e exercício: efeitos, secreção e metabolismo. **Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício - Volume 10** Número 3

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

CAMPOS, H.S; XISTO, D.G; OLIVEIRA; TEIXEIRA, I; NEGRI, E.M; MAUAD, T; CARNIELLI, D; LIMA, L.M; BARREIRO, E.J; FAFPE, D.S; ZIN, W.A; LAPA E SILVA, J.R; ROCCO, P.R.M. 2006. Protective effects of phosphodiesterase inhibitors on lung function and remodeling in a murine model of chronic asthma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **vol.39 no.2**

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

CASTARDO, J.C; PRUDENTE, A.S; FERREIRA, J; GUIMARÃES, C.L; MONACHE, F.D; FILHO, V.C; OTUKI, M.F; CABRINI, D.A. 2008. Anti-Inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garciniagardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology** **118** (2008) 405–411

COLLING, X; ROBERT, J.M; WIELGOSZ, G; LE BAUT, G; BOBIN-DOBIGEON; GRIMAUD N; PETIT, J.Y. 2001. New anti-inflammatory *N*-pyridinyl(alkyl)phthalimides acting as tumour necrosis factor- $\alpha$  production inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 36(7-8): 639-649

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

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

CORTRIGHT, R.N; CHANDLER M.P; LEMON, P.W.R; DICARLO, S.E.1997. Daily Exercise Reduces Fat, Protein and Body Mass in Male but not Female Rats. **Physiology&Behavior**. **Vol.62, Issue 1**,105-111

D'AGOSTINO, G; RANA, G.L; RUSSO, R; SASSO, O; LACONO, A; ESPOSITO, E; RASO, G.M; CUZZOCREA, S; VERME, J.L; PIOMELLI, D; MELI, R; CALIGNANO, A. 2007. **The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**. **JPET322**:1137–1143

DALL'AGNOL, R. S. A. Identificação e quantificação dos problemas relacionados com medicamentos em pacientes que buscam atendimento no serviço de emergência do HCPA. 2004. Dissertação (pós-graduação nível mestrado). Porto Alegre, 2004.

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

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

DRUGDEX, 2003. CD-ROM Micromedex, versão 4<sup>o</sup> trim/2003.

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

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

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

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

FALCÃO, E.P.S.; MELO, S.J.; SRIVASTAVA, R.M.; CATANHO, M.T.J.A.; NASCIMENTO, S.C. 2006. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3-and 4-(N-phthalimidophenyl)}pyrimidines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **41(2)**: 276-282

FAVER, I.R.; GUERRA, S.G.; SU, W.P.D.; AZHARKY, R. 2005. Thalidomide for dermatology: a review of clinical uses and adverse effects. **International of Dermatology**, **44**, 61-67.

FDA.IV.C.3.a. Short-Therm ToxicitySutudies with Rodents. In: Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients.2003**Redbook 2000**.

FERRETI, S; BONNEAU, O; DUBOIS, G R; JONES, C E; TRIFILIEFF, A. 2003. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. **The journal of immunology 170**:2106-2112.

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

GEYER, H.LMD; VIGGIANO, R.W; LACY, M.Q; WITZIG, T.M; LESLIE, K.O; MIKKHAEL, J.R; STEWART, K.2011. Acute Lung Toxicity Related to Pomalidomide.**Chest Journal, Vol.140 No.2**, 529-533.

GORDON, G.B; SPIELBERG, S.P; BLAKE, D.A; BALASUBRAMANIAN, V. Thalidomide teratogenesis: Evidence for a toxic areneoxide metabolite.1980.**Medical Sciences, Vol. 78, No. 4**, 2545-2548.

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

HEINRICH, P.C; CASTELL, J.V; ANDUS, T. 1990.Interleukin-6 and the acute phase response.**Biochemical Journal 265(3)**: 621-636.

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

<http://www.drugs.com/sfx/pomalidomide-side-effects.html> (acessado em 2 de junho de 2013 às 19:04)



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

JEANNY, B; CHING, J.B.A; LI, H; GARDNER, E.R; FIGG, W.D. 2007. Thalidomide Analogues as Anticancer Drugs. **Recent Pat Anticancer Drug Discov.** **2007 June** ; **2(2)**: 167–174.

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

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

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

KISHIMOTO, J. 1989. The Biology of Interleukin 6. **Blood**, **74** : 1-10.

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

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

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

LIN, Q. Y.; L. J. JIN, ET AL. 2008. Protective effect of Acanthopanax senticosus extract against endotoxic shock in mice. **Journal of Ethnopharmacology** **118**: 495-502.

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

LOPEZ-GIRONA, A; MENDY, D; ITO, T; MILLER, K; GANDHI, A.K; KANG, J; KARASAWA, S; GARMEL, G; JACKSON, P; ABBASIAN, M; MAHMOUDI, H; CATHERS, B; RYCHAK, E; GAIDAROVA, S; CHEN, R; SCHAIFER, P.H; HANDA, H; DANIEL, T.O; EVANS, J.F; CHOPRA, R. 2012. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. **Leukemia**, **26**, 2326–2335

MACHADO, A.L.; LIMA, L.M; ARAÚJO-JR, J.X; FRAGA, C.A.M; KOATZ, V.L.G; BARREIRO, E.J.2005. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **15** 1169-1172.

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

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

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

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

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

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

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

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

MOHEBBATIKALJAH, H; MENEVSE, S; YETKIN , I; DEMIRCI, H. Study of interleukin-10 promoter region polymorphisms (-1082A/G, -819T/C and -592A/C) in type 1 diabetes mellitus in Turkish population. 2009. **Journal of Genetics**. Vol.99, N<sup>o</sup>2.

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

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

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

MULDUR, E. 2012. Dexamethasone/lenalidomide Various toxicities in an elderly patient: case. **Reactions** **1408**: 30.

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

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

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

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

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

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

PARMAN, T.; WILEY, M.J.; WELLS, P.G. 1999. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. **Nature Medicine**, **5**, 582-585.

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

PERRI III, J, A; SYLVIA, H. "A review of thalidomide's history and current dermatological applications. 2003. **Dermatology Online Journal**, **9** (3):5

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

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

PRAUSE, O; BOSSIOS, A; SILVERPIL, E; IVANOV, S; BOZINOVSKI, S; VLAHOS, R; SJOSTRAND, M; ANDERSON, G P; LINDEN, A. 2009. IL-17-producing T lymphocytes in lung tissue and in the bronchoalveolar space after exposure to endotoxin from Escherichia coli in vivo – effects of anti-inflammatory pharmacotherapy. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics** **22**:199–207.

RAETZ, C.R.H; WHITFIELD, C. 2002. Lipopolisaccharide Endotoxins. **Annual Reviews Biochemistry**, **71**:635-700.

RAFIEE, P; STEIN, D,J; NELSON,V,M; OTTERSON,M,F; SHAKER, R AND BINION,D,G. 2009. Thalidomide inhibits inflammatory and angiogenic activation of human intestinal microvascular endothelial cells (HIMEC). **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology** **298**: G167-G176

RAJE, N. AND K. ANDERSON. 1999. Thalidomide--a revival story. **The New England Journal of Medicine** **341**: 1606-1609.

RAND, G.M. e PETROCELLI, S.R. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology Washington. **Publinshing. Hemisphere. 665 p**

RANDALL, T. 1990. Thalidomide has 37-year history. **Journal of the American Medical Association**, **263**: 1474.

ROCHA, A.C.C; FERNANDES, E.S; QUINTÃO, N.L.M; CAMPOS, M.M; CALIXTO, J.B. 2006. Relevance of tumour necrosis factor- $\alpha$  for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. **British Journal of Pharmacology**, **148**, 688–695

ROMANELLI, M. F. Avaliação da toxicidade aguda e crônica de surfactantes de superfície e las submetidos à irradiação com feixes de elétrons. Tese

(Dissertação de Mestrado - Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações).2004.**Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo. São Paulo**

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

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

SAMPAIO, E.P.; MOREIRA, A.L.; SARNO, E.N.; MALTA, A.M.; KAPLAN, G. 1992. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosumleprosum in lepromatous leprosy patients. **The Journal of Experimental Medicine, 175**: 1729-1737.

SAMPAIO, E.P.; KAPLAN, G.; MIRANDA, A.; NERY, J.A.; MIGUEL, C.P.; VIANA, S.M.; SARNO, E.N. 1993. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosumleprosum. **The Journal of Infectious Diseases, 168(2)**: 408-414.

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

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

SCHUMACHER, H.; SMITH, R. L.; WILLIAMS, R. T. 1965. The metabolism of thalidomide: the spontaneous hydrolysis of thalidomide in

solution. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, **25(2)**: 324-337.

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

SCHMAHI, H.J; NAU, H; NEUBERT, D. The enantiomers of the teratogenic thalidomide analogue EM 12: 1. Chiral inversion and plasma pharmacokinetics in the marmoset monkey. 1988. **Archives of Toxicology**, **62(2-3)**:200-4.

SHARMA, R.A; STEWARD , W.P; DAINES, C.A; KNIGHT, R.D; O'BYNE K.J; DALGLEISH, A.G.2006.Toxicity profile of the immunomodulatory thalidomide analogue, lenalidomide: Phase I clinical trial of three dosing schedules in patients with solid malignancies. **European Journal of Cancer**, **Volume 42, Issue 14**: 2318-2325.

SIMONS, R K ; MAIER, R V ; CHI, EY.1991.Pulmonary effects of continuous endotoxin infusion in rat. **CircShock**,**1:33**: 233-43.

SODRÉ, F L; COSTA, J C B; LIMA, J C C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial.2007. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. vol.43 no.5 Rio de Janeiro

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

TOBACMAN, JK. 2001.Review of Harmful Gastrointestinal Effects of Carrageenan in Animal Experiments. **Environmental Health Perspectives** **109(10)**: 983-994

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

TURK, B.E.; JIANG, H.; LIU, J. O. 1996.Binding of thalidomide to alpha1-acid glycoprotein may be involved in its inhibition of tumor necrosis factor alpha

production. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, **93(15)**: 7552-7556.

VAN CAUTER, E; HOLMBACK, U; KNUTSON, K; LEPROULT, R; MILLER, A; NEDELTCHEVA, A; PANNAIN, S; PENEV, P; TASALI, E; SPIEGEL, K. 2007. Impact of Sleep and Sleep Loss on Neuroendocrine and Metabolic Function. **Hormone Research In Pediatrics**, **67**:2-9.

WATT, J; MARCUS, R. 1969. Ulcerative colitis in the guinea-pig caused by seaweed extract. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **21**:187S–188S

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

WINKLER, M; SCHUMANN, G; PETERSEN, D; OELLERICH, M; WONIGEIT, K. Monoclonal fluorescence polarization immunoassay evaluated for monitoring cyclosporine in whole blood after kidney, heart and liver transplantation. 1992. **ClinChem** **1992**; **38**: 123-6

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

WU, J. J., D. B; HUANG, ET AL. 2005. Thalidomide: dermatological indications, mechanisms of action and side-effects. **British Journal of Dermatology**, **153**: 254-273.

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

ZHANG, X; HUANG, H; YANG, T; YE, Y; SHAN, J; YING, Z; LUO, LAN. 2010. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Injury Injury, Int. J. Care Injured xxx (2010) xxx–xxx**.

ZHOU, H. Y.; E. M. SHIN; ET AL. 2008. Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in



RAW 264.7 macrophages via NF-kappaB, JNK and p38 MAPK inactivation. **European Journal of Pharmacology** **586**: 340-349.

ZHU, Y.X; BRAGGIO, E; SHI, C.X; BRUINS, L.A; SCHMIDT, J.E; VANWIER, S; CHANG, X.B; BJORKLUND, C.C; FONSECA, R; BERGSAGEL, P.L; ORLOWSKI, R.Z; STEWART, A.K. 2011. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. **Blood Journal**, **118**: 4771-4779

## 8- ANEXOS

### 8.1- Aumento do edema de pata dos camundongos nos tempos de 1-24 horas após serem submetidos à carragenina 2%

Tabela 1. Aumento do edema de pata dos camundongos do grupo Salina nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após serem submetidos à carragenina 2%

Camundongo	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	6 Horas	24 Horas
1	0,93	1,08	1,48	1,18	1,18	1,28
2	1,05	1,6	1,6	1,6	1,6	2,0
3	1,0	1,0	1,10	1,4	1,5	2,0
4	1,3	1,6	1,6	1,6	2,0	2,5
5	0,8	1,3	1,3	1,3	1,5	2,0

Tabela 2. Aumento do edema de pata dos camundongos do grupo talidomida 10mg/Kg nos tempos de 1,2,3,4,6 e 24 horas após serem submetidos à carragenina 2%

Camundongo	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	6 Horas	24 Horas
1	0,6	0,6	1,2	1,2	1,2	1,2
2	0,3	0,4	0,4	0,45	0,6	0,65
3	0,55	0,7	1,0	1,2	1,2	1,0
4	0,35	0,8	0,9	1,0	1,10	0,7
5	0,5	0,55	0,6	0,6	0,6	0,6

Tabela 3. Aumento do edema de pata dos camundongos do grupo SC15 10mg/Kg nos tempos de 1,2,3,4,6 e 24 horas após serem submetidos à carragenina 2%.

Camundongo	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	6 Horas	24 Horas
1	0,55	0,93	0,93	1,00	1,2	1,2
2	0,67	0,97	1,07	1,27	1,37	0,97
3	0,55	0,55	0,55	0,85	1,10	1,10
4	0,8	0,9	1,13	1,2	1,7	1,7
5	0,5	1,3	1,10	1,5	1,25	1,20

Tabela 4. Aumento do edema de pata dos camundongos do grupo GI16 10mg/Kg nos tempos de 1,2,3,4,6 e 24 horas após serem submetidos à carragenina 2%.

Camundongo	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	6 Horas	24 Horas
1	0,67	0,7	0,65	1,0	1,4	1,4
2	0,6	0,6	0,6	0,6	1,3	1,3
3	0,7	0,8	0,75	0,7	1,10	1,2
4	0,72	0,72	0,92	0,87	1,62	1,22
5	0,47	0,77	0,82	0,92	0,67	0,67

Tabela 5. Aumento do edema de pata dos camundongos do grupo Dexametasona 10mg/Kg nos tempos de 1,2,3,4,6 e 24 horas após serem submetidos à carragenina 2%.

Camundongo	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	6 Horas	24 Horas
1	0,3	0,3	0,3	0,33	0,4	0,6
2	0,9	0,55	0,6	0,55	0,6	0,85
3	0,3	0,2	0,15	0,2	0,3	0,6
4	0,6	0,5	0,4	0,35	0,5	0,8
5	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5

Tabela 6. Aumento do edema de pata dos camundongos do grupo talidomida 50mg/Kg nos tempos de 1,2,3,4,6 e 24 horas após serem submetidos à carragenina 2%.

Camundongo	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	6 Horas	24 Horas
1	0,7	0,45	0,25	0,25	0,25	0,25
2	0,5	0,45	0,3	0,3	0,25	0,25
3	0,45	0,4	0,3	0,3	0,3	0,25
4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3
5	0,45	0,45	0,45	0,35	0,35	0,3

Tabela 7. Aumento do edema de pata dos camundongos do grupo SC15 50mg/Kg nos tempos de 1,2,3,4,6 e 24 horas após serem submetidos à carragenina 2%.

Camundongo	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	6 Horas	24 Horas
1	0,55	0,5	0,65	0,65	0,7	0,9
2	0,5	0,65	0,5	0,5	0,65	0,65
3	0,7	0,5	0,4	0,4	0,4	0,8
4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
5	0,1	0,1	0,35	0,4	0,5	0,5

Tabela 8. Aumento do edema de pata dos camundongos do grupo GI16 50mg/Kg nos tempos de 1,2,3,4,6 e 24 horas após serem submetidos à carragenina 2%.

Camundongo	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	6 Horas	24 Horas
1	0	0,1	0,1	0,25	0,25	0,3
2	0,45	0,5	0,5	0,6	0,6	0,75
3	0,45	0,45	0,45	0,5	0,5	0,5
4	0,35	0,35	0,6	0,5	0,2	0,2
5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

## 8.2- Teste de toxicidade aguda

### 8.2.1- Consumo Alimentar e hídrico

Tabela 9. Consumo alimentar médio (g) dos ratos Wistar fêmeas tratados com talidomida ou análogos pertencentes ao teste de toxicidade aguda

SEMANA	GRUPOS			
	TALIDOMIDA	GI-16	SC-15	SALINA
1	19	18	18,5	20
2	18,08	16,30	18	19
3	16	19	17,6	19,4
4	18,14	17	18	19
MÉDIA	17,8	17,57	18,02	19,35
SD	1,27	1,17	0,36	0,4

Tabela 10. Consumo alimentar médio (g) dos ratos Wistar machos tratados com talidomida ou análogos pertencentes ao teste de toxicidade aguda

SEMANA	GRUPOS			
	TALIDOMIDA	GI-16	SC-15	SALINA
1	25	26,3	26	27
2	24,20	25	27	26,78
3	24,4	25,4	25	24,97
4	25	27	25,01	29,42
MÉDIA	24,65	26,67	25,75	27
SD	0,41	0,89	0,95	1,82

Tabela 11. Consumo hídrico médio (ml) dos ratos Wistar fêmeas tratados com talidomida ou análogos pertencentes ao teste de toxicidade aguda

SEMANA	GRUPOS			
	TALIDOMIDA	GI-16	SC-15	SALINA
1	26,42	26,2	24,32	25,6
2	24,5	23,09	27,38	25,32
3	28	27,85	25,78	26,21
4	24	22,33	26,32	28
MÉDIA	25,73	24,97	25,95	26,28
SD	1,83	2,67	1,92	1,2

Tabela 12. Consumo hídrico médio (ml) dos ratos Wistar machos tratados com talidomida ou análogos pertencentes ao teste de toxicidade aguda

SEMANA	GRUPOS			
	TALIDOMIDA	GI-16	SC-15	SALINA
1	38	36,43	36	33,4
2	34	33,33	32,6	32,56
3	39	34,3	38,6	30,56
4	33	35,2	30	35,12
MÉDIA	36	34,81	32,8	32,9
SD	2,94	1,31	3,08	1,89

### 8.2.2- Ganho de peso

Tabela 13. Ganho de peso (g) dos ratos Wistar fêmeas tratados com talidomida ou análogos pertencentes ao teste de toxicidade aguda.

SEMANA	GRUPOS			
	TALIDOMIDA	GI-16	SC-15	SALINA
1	220,0	223,66	226,25	196,66
2	220,0	221,20	227,75	204,43
3	229,6	233,10	242,25	215,33
4	234,7	233,20	241,75	222,00
MÉDIA	226	227,79	234,5	209,6
SD	7,31	6,27	8,68	11,26

Tabela 14. Ganho de peso (g) dos ratos Wistar machos tratados com talidomida ou análogos pertencentes ao teste de toxicidade aguda

SEMANA	GRUPOS			
	TALIDOMIDA	GI-16	SC-15	SALINA
1	309,33	310,66	319,00	313,66
2	309,33	318,00	320,25	330,60
3	309,33	318,00	320,25	330,60
4	322,00	328,30	348,25	345,17
MÉDIA	312,49	318,74	326,87	330
SD	6,33	7,25	14,26	12,9

### 8.2.3- Parâmetros bioquímicos

Tabela 15. Parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar fêmeas (0) e machos (1) tratados com talidomida e pertencentes ao teste de toxicidade aguda.

Grupo	Sexo	Creatinina	CT	TG	ALT	AST	FAL	GLI
<b>Talidomida</b>		mg/dL	mg/dL	mg/dL	U/L	U/L	U/L	mg/dL
	0	0,9	64	73	250	90	220	112
	0	0,8	72	65	219	112	219	110
	0	0,7	78	68	235	112	215	121
	0	1	69	71	242	117	232	125
	0	0,8	70	73	201	122	222	107
	1	0,7	73	69	248	95	211	105
	1	0,7	75	67	237	97	219	114
	1	0,7	78	66	240	102	249	118
	1	0,9	77	69	213	106	236	121
	1	0,8	71	70	222	91	231	119
MÉDIA		0,80	72,70	69,10	230,70	104,40	225,40	115,20
SD		0,11	4,47	2,73	16,17	11,17	11,46	6,63

Tabela 16. Parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar fêmeas (0) e machos (1) tratados com GI-16 e pertencentes ao teste de toxicidade aguda.

Grupo	Sexo	Creatinina	CT	TG	ALT	AST	FAL	GLI
<b>GI-16</b>		mg/dL	mg/dL	mg/dL	U/L	U/L	U/L	mg/dL
	0	0,7	73	74	247	90	230	117
	0	0,8	67	70	222	95	215	109
	0	0,7	80	65	241	122	217	115
	0	0,6	65	73	222	115	231	119
	0	0,9	70	72	211	91	223	123
	1	0,9	75	71	237	96	211	127
	1	0,7	75	68	248	110	218	112
	1	0,6	82	67	231	101	236	101
	1	0,8	75	73	212	104	247	100
	1	0,8	73	75	223	93	235	103
MÉDIA		0,75	73,50	70,80	229,40	101,70	226,30	112,60
SD		0,11	5,25	3,26	13,51	10,89	11,36	9,31

Tabela 17. Parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar fêmeas (0) e machos (1) tratados com SC-15 e pertencentes ao teste de toxicidade aguda.

<b>Grupo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Creatinina</b>	<b>CT</b>	<b>TG</b>	<b>ALT</b>	<b>AST</b>	<b>FAL</b>	<b>GLI</b>
<b>SC15</b>		mg/dL	mg/dL	mg/dL	U/L	U/L	U/L	mg/dL
	0	0,6	75	70	223	93	232	122
	0	0,8	80	72	216	97	220	104
	0	0,7	65	73	237	117	247	107
	0	0,8	65	62	241	123	223	106
	0	1	75	70	243	94	231	115
	1	0,9	80	71	232	100	217	113
	1	0,8	77	69	234	97	216	112
	1	0,6	72	74	219	98	238	100
	1	0,7	73	73	217	111	217	99
	1	0,8	74	71	221	95	238	125
MÉDIA		0,77	73,60	70,50	228,30	102,50	227,90	110,30
SD		0,13	5,25	3,37	10,25	10,59	10,86	8,74

Tabela 18. Parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar fêmeas (0) e machos (1) tratados com solução salina (CS) e pertencentes ao teste de toxicidade aguda.

<b>Grupo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Creatinina</b>	<b>CT</b>	<b>TG</b>	<b>ALT</b>	<b>AST</b>	<b>FAL</b>	<b>GLI</b>
<b>CS</b>		mg/dL	mg/dL	mg/dL	U/L	U/L	U/L	mg/dL
	0	0,6	65	65	237	123	220	118
	0	0,8	70	71	221	93	218	97
	0	0,7	80	69	233	111	236	111
	0	0,9	69	74	240	124	230	109
	1	0,7	73	81	209	116	218	114
	1	0,6	77	69	212	96	215	121
	1	0,8	74	69	235	97	219	123
	1	0,9	79	64	241	100	241	120
	1	0,8	80	68	215	104	235	103
MÉDIA		0,76	74,11	70,00	227,00	107,11	225,78	112,89
SD		0,11	5,35	5,07	12,72	11,82	9,72	8,77



## 8.2.4-Parâmetros hematológicos

Tabela 19. Parâmetros hematológicos dos ratos Wistar fêmeas (0) e machos (1) tratados com talidomida e pertencentes ao teste de toxicidade aguda.

Grupo Talidomida	Sexo	Hemácias				Segmentados	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Plaquetas
		milhões/ml	HCT %	HB mg/dl	LG %					
	0	7,6	43,8	14,6	7	21	70	4	5	619
	0	7,1	44,6	14,9	6	23	72	3	2	531
	0	7,4	45	15	7	23	67	5	5	624
	0	7,5	36,1	12	6	24	69	3	4	791
	0	7,3	41	13,9	8	24	75	6	4	671
	1	7,2	44,5	15	7	20	71	5	2	722
	1	7,3	43,2	14,5	7	23	70	5	3	789
	1	7	42,9	14,3	7	21	70	5	3	651
	1	6,8	45,5	15,4	7	24	66	6	4	561
	1	6,5	44,8	15	6,7	18	74	7	7	585
MÉDIA		7,1	42,9	14,4	6,9	22,4	70,5	3,8	3,3	654,7
SD		0,27	2,6	0,86	0,39	2,06	2,35	1,58	0,45	84,3

Tabela 20. Parâmetros hematológicos dos ratos Wistar fêmeas (0) e machos (1) tratados com GI-16 e pertencentes ao teste de toxicidade aguda.

Grupo GI-16	Sexo	Hemácias				Segmentados	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Plaquetas
		milhões/ml	HCT %	HB mg/dl	LG %					
	0	7,1	44,8	15,0	7	29	59	5	7	585
	0	7,5	42,5	14,2	6	17	75	5	3	642
	0	7,6	43,0	14,4	6	17	72	6	5	703
	0	7,1	44,0	14,7	8	12	74	9	5	632
	0	6,9	37,8	12,5	7	16	75	8	1	578
	1	7,4	44,2	14,9	6	18	76	4	2	682
	1	7,5	42,4	14,2	6	20	69	10	1	731
	1	7,3	44,0	14,7	6	25	64	7	4	800
	1	7,2	45,1	15,1	6	30	64	3	3	777
	1	6,4	41,7	14,0	6	21	73	3	3	530
MÉDIA		7,1	42,9	14,4	6,9	22,4	70,5	3,8	3,3	654,7
SD		0,27	2,6	0,86	0,39	2,06	2,35	1,58	0,45	84,3

Tabela 21. Parâmetros hematológicos dos ratos Wistar fêmeas (0) e machos (1) tratados com SC-15 e pertencentes ao teste de toxicidade aguda.

Grupo SC-15	Sexo	Hemácias				Segmentados	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Plaquetas
		milhões/ml	HCT %	HB mg/dl	LG %					
	0	6,1	40,0	13,3	6	24	67	3	6	651
	0	7,6	42,1	14,0	5	32	64	2	2	743
	0	7,5	45,3	15,3	7	20	74	3	3	792
	0	7,3	45,1	15,1	7	37	60	2	1	600
	0	7,0	43,2	14,5	7	20	69	4	7	553
	1	7,5	45,0	15,0	6	20	72	5	3	572
	1	7,4	45,3	15,1	8	20	70	5	5	635
	1	7,0	41,0	13,7	6	22	71	5	2	584
	1	7,3	39,1	13,0	8	17	72	8	3	641
	1	7,3	43,4	14,5	7	13	77	5	5	700
MÉDIA		7,1	42,9	14,4	6,9	22,4	70,5	3,8	3,3	654,7
SD		0,27	2,6	0,86	0,39	2,06	2,35	1,58	0,45	84,3

Tabela 22. Parâmetros hematológicos dos ratos Wistar fêmeas (0) e machos (1) tratados com solução salina (CS) e pertencentes ao teste de toxicidade aguda.

Grupo CS	Rato	Hemácias					Segmentados	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Plaquetas
		milhões/ml	HCT %	HB mg/dl	LG %	%					
	0	7,5	46,9	15,7	6	19	71	7	3	704	
	0	7,0	45,6	15,2	6	12	78	5	5	684	
	0	7,2	43,7	14,6	7	20	70	6	4	703	
	0	7,6	43,1	14,4	7	18	73	7	2	681	
	0	6,8	48,0	16,3	6	24	69	4	3	672	
	1	7,7	39,0	12,8	6	19	72	7	2	628	
	1	7,3	44,9	15,0	7	13	75	7	5	554	
	1	7,4	47,2	15,7	6	15	73	7	5	527	
	1	7,5	41,4	13,9	7	17	75	5	3	620	
	1	7,5	46,9	15,7	6	19	71	7	3	704	
MÉDIA		7,1	42,9	14,4	6,9	22,4	70,5	3,8	3,3	654,7	
SD		0,27	2,6	0,86	0,39	2,06	2,35	1,58	0,45	84,3	

### 8.3- Toxicidade sub-crônica

#### 8.3.1- Consumo alimentar e hídrico

Tabela 23. Consumo alimentar médio (g) dos ratos Wistar fêmeas tratados com talidomida ou análogos e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica

SEMANA	GRUPOS				
	TALIDOMIDA	GI-16	SC-15	SALINA	DMSO-SALINA
1	19	18	18,5	20	21,30
2	18,08	16,30	18	19	19
3	16	19	17,6	19,4	18,18
4	18,14	17	18	19	18,6
MÉDIA	17,8	17,57	18,02	19,35	19,27
SD	1,27	1,17	0,36	0,4	1,39

Tabela 24. Consumo alimentar médio (g) dos ratos Wistar machos tratados com talidomida ou análogos e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica

SEMANA	GRUPOS				
	TALIDOMIDA	GI-16	SC-15	SALINA	DMSO-SALINA
1	25	26,3	26	33,25	29
2	24,20	25	27	30	29
3	24,4	25,4	25	30,12	28,6
4	25	27	25,01	29,42	29,20
MÉDIA	24,65	25,9	25,75	30,69	28,95
SD	0,41	0,89	0,95	1,72	0,25

Tabela 25. Consumo hídrico médio (ml) dos ratos Wistar fêmea tratados com talidomida ou análogos e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica

SEMANA	GRUPOS				
	TALIDOMIDA	GI-16	SC-15	SALINA	DMSO-SALINA
1	26,42	26,6	32,6	35,2	35,36
2	24,5	23,09	27,38	32,14	25
3	28	27,85	30,23	30	25,5
4	24	22,33	31,33	32	26
MÉDIA	25,73	24,97	30,38	32,33	27,9
SD	1,83	2,67	1,92	2,14	4,94

Tabela 26. Consumo hídrico médio (ml) dos ratos Wistar machos submetido à talidomida ou análogos e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica

SEMANA	GRUPOS				
	TALIDOMIDA	GI-16	SC-15	SALINA	DMSO-SALINA
1	38	36,43	36	36,42	45
2	34	33,33	32,6	46,425	40
3	39	34,3	38,6	42,85	41,42
4	33	35,2	30	45,5	40,50
MÉDIA	36	34,81	32,8	42,79	41,73
SD	2,94	1,31	3,77	4,51	2,25

### 8.3.2- Ganho de Peso

Tabela 27. Ganho de peso (g) dos ratos Wistar fêmeas tratados com talidomida ou análogos e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica.

SEMANA	GRUPOS				
	TALIDOMIDA	GI-16	SC-15	SALINA	DMSO-SALINA
1	220,0	223,66	226,25	196,66	207,66
2	220,0	221,20	227,75	204,43	206,80
3	229,6	233,10	242,25	215,33	216,00
4	234,7	233,20	241,75	222,00	216,00
MÉDIA	226	227,79	234,5	209,6	211,61
SD	7,31	6,27	8,68	11,26	5,07

Tabela 28. Ganho de peso (g) dos ratos Wistar machos tratados com talidomida ou análogos e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica.

SEMANA	GRUPOS				
	TALIDOMIDA	GI-16	SC-15	SALINA	DMSO-SALINA
1	309,33	310,66	319,00	313,66	326,66
2	309,33	318,00	320,25	330,60	326,20
3	309,33	318,00	320,25	330,60	313,66
4	322,00	328,30	348,25	345,17	341,33
MÉDIA	312,49	318,74	326,87	330	326,96
SD	6,33	7,25	14,26	12,9	11,31

### 8.3.3- Parâmetros bioquímicos

Tabela 29. Parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar fêmeas (0) e machos (1) tratados com talidomida e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica

Grupo	Sexo	Creatinina	CT	TG	ALT	AST	FAL	GLI
Talidomida		mg/dL	mg/dL	mg/dL	U/L	U/L	U/L	mg/dL
	0	0,9	77	69	213	106	229	99
	0	0,7	78	68	235	112	215	112
	0	0,6	65	73	222	115	231	124
	0	0,6	82	67	231	101	236	120
	0	0,7	65	73	237	117	247	121
	0	0,8	65	62	241	123	223	103
	1	0,9	69	74	240	124	230	112
	1	0,7	73	81	209	116	218	117
	1	0,6	77	69	212	96	215	119
	1	0,7	78	66	240	102	249	109
	1	0,9	77	69	213	106	235	108
	1	0,8	80	75	230	99	218	119
MÉDIA		0,74	73,83	70,50	226,92	109,75	228,83	113,58
SD		0,12	6,24	4,98	12,39	9,40	11,61	7,73

Tabela 30. Parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar fêmeas (o) e machos (1) tratados com GI-16 e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica

<b>Grupo</b> <b>GI-16</b>	<b>Sexo</b>	<b>Creatinina</b> mg/dL	<b>CT</b> mg/dL	<b>TG</b> mg/dL	<b>ALT</b> U/L	<b>AST</b> U/L	<b>FAL</b> U/L	<b>GLI</b> mg/dL
	0	0,9	64	73	250	91	240	125
	0	0,8	72	65	219	112	219	101
	0	0,9	69	74	240	124	231	105
	0	0,7	73	81	209	116	219	106
	0	0,6	77	69	212	99	214	99
	0	0,8	74	72	235	114	219	98
	1	0,8	77	69	234	97	222	104
	1	0,6	72	74	219	107	239	107
	1	0,9	70	72	211	120	223	117
	1	0,9	75	71	237	96	212	121
	1	0,7	75	68	248	110	213	123
MÉDIA		0,78	72,55	71,64	228,55	107,82	222,82	109,64
SD		0,12	3,83	4,15	15,03	10,75	9,80	9,97

Tabela 31. Parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar fêmeas (o) e machos (1) tratados com SC-15 e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica

<b>Grupo</b> <b>SC-15</b>	<b>Sexo</b>	<b>Creatinina</b> mg/dL	<b>CT</b> mg/dL	<b>TG</b> mg/dL	<b>ALT</b> U/L	<b>AST</b> U/L	<b>FAL</b> U/L	<b>GLI</b> mg/dL
	0	0,6	82	69	230	102	219	118
	0	0,6	68	83	217	116	227	122
	0	0,7	77	81	210	114	217	119
	0	0,6	80	69	214	103	214	117
	0	0,8	74	78	235	114	223	116
	0	0,6	65	65	237	123	220	102
	1	0,8	81	70	215	103	233	103
	1	0,7	65	73	237	117	247	117
	1	0,8	65	62	241	123	223	116
	1	0,7	80	69	212	99	219	108
	1	0,8	74	74	231	114	214	100
MÉDIA		0,70	73,73	72,09	225,36	111,64	223,27	112,55
SD		0,09	6,87	6,50	11,76	8,51	9,64	7,78

Tabela 32. Parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar fêmeas (0) e machos (1) tratados com solução salina (CS) e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica

Grupo	Sexo	Creatinina	CT	TG	ALT	AST	FAL	GLI
CS		mg/dL	mg/dL	mg/DL	U/L	U/L	U/L	mg/dL
	0	0,6	77	69	212	111	215	118
	0	0,8	74	74	235	97	219	122
	0	0,9	81	64	241	100	241	117
	1	0,8	80	68	215	104	235	102
	1	0,9	64	73	250	93	220	103
MÉDIA		0,80	75,20	69,60	230,60	101,00	226,00	112,40
SD		0,12	6,83	4,04	16,53	6,89	11,31	9,24

Tabela 33. Parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar fêmeas (0) e machos (1) tratados com solução salina com 10% de DMSO (CD) e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica

Grupo	Sexo	Creatinina	CT	TG	ALT	AST	FAL	GLI
CD		mg/dL	mg/dL	mg/dL	U/L	U/L	U/L	mg/dL
	0	0,6	80	69	214	103	214	102
	0	0,8	74	78	233	114	223	117
	0	0,6	65	73	222	115	231	116
	0	0,6	82	67	231	101	236	136
	1	0,8	67	70	222	100	215	125
	1	0,6	77	69	212	96	216	101
	1	0,8	74	69	235	98	219	100
	1	0,7	81	74	219	116	242	96
MÉDIA		0,69	75,00	71,13	223,50	105,38	224,50	111,63
SD		0,10	6,32	3,60	8,67	8,25	10,60	14,17

### Legenda

**CT:** Colesterol total

**TG:** Triglicérides

**ALT:** Alanina aminotransferase

**AST:** Aspartato aminotransferase

**FAL:** Fosfatase alcalina

**GLI:** Glicose

**CS:** Controle salina

**CD:** Controle DMSO-salina

**SD:** Desvio-padrão

### 8.3.4 Parâmetros hematológicos

Tabela 34 Parâmetros hematológicos dos ratos wistar machos (1) e fêmeas (0) tratados com talidomida e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica.

Grupo Talidomida	Rato	Hemácias				Segmentados	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Plaquetas
		milhões/ml	HCT %	HB mg/dl	LG %					
	0	7,5	42,9	14,3	6,9	22	71	3	4	615
	0	7,4	44,6	14,9	6,1	22	70	5	3	532
	0	6,9	43,5	14,5	7,1	26	68	2	4	614
	0	7,3	36,1	12	6,5	22	70	5	3	789
	0	7,1	41	13,9	7,3	21	73	3	3	675
	0	7,2	44,5	15	6,8	19	74	4	3	720
	1	7,3	43,2	14,5	6,4	24	70	2	4	792
	1	7	41,8	14	7,2	21	70	6	3	655
	1	6,9	45,5	15,4	7,4	24	66	7	3	632
	1	6,5	44,8	15	6,7	20	74	3	3	571
	1	7,1	42,6	14,2	7,1	23	71	3	3	561
	1	7,4	43,8	14,6	7	25	69	3	3	700
MÉDIA		7,1	42,9	14,4	6,9	22,4	70,5	3,8	3,3	654,7
SD		0,27	2,6	0,86	0,39	2,06	2,35	1,58	0,45	84,3

Tabela 35 Parâmetros hematológicos dos ratos wistar machos (1) e fêmeas (0) tratados com GI-16 e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica durante 28 dias de experimento

Grupo GI-16	Rato	Hemácias				Segmentados	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Plaquetas
		milhões/ml	HCT %	HB mg/dl	LG %					
	0	6,5	40	13,1	6,5	24	68	3	5	655
	0	7,4	42	13,8	5,3	30	66	2	2	740
	0	7,5	45	15	6,7	21	73	3	3	786
	0	7,3	44	15,1	7,1	35	61	2	2	621
	0	6,9	43	14,3	7,3	20	70	5	5	543
	0	7,4	43,8	14,6	6	19	73	5	3	572
	1	7,5	45,4	15,2	7,7	20	73	4	3	638
	1	7,1	41	13,5	6,4	22	72	4	2	597
	1	7	38,8	13	7,6	20	72	6	2	637
	1	7,2	43,4	14,4	7,1	16	74	5	5	702
	1	7,3	43	14,2	7,2	21	73	3	3	691
MÉDIA		7,2	42,7	14,2	6,8	22,5	69,5	3,8	3,18	652,9
SD		0,3	2,04	0,77	0,72	5,41	4,16	1,32	1,25	72,39

Tabela 36 Parâmetros hematológicos dos ratos wistar machos (1) e fêmeas (0) tratados com SC-15 e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica durante 28 dias de experimento

Grupo SC-15	Rato	Hemácias				Segmentados	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Plaquetas
		milhões/ml	HCT %	HB mg/dl	LG %					
	0	7,5	46,3	15,4	6,3	19	73	5	3	700
	0	7	44,7	15	7,3	15	78	3	4	677
	0	7,2	43,7	14,3	6,1	20	73	3	4	713
	0	7,6	43,1	14,4	6,6	18	75	5	2	688
	0	6,8	47,6	16	6,4	24	69	4	3	670
	0	7,7	39	12,9	5,9	19	72	7	2	645
	1	7,3	44,9	15	6,1	13	75	7	5	560
	1	7,4	46,2	15,5	6,3	15	72	8	5	532
	1	7,5	41,4	13,9	7,1	18	74	5	3	618
	1	7	39	13,5	6,7	21	73	4	2	645
	1	6,9	41,2	14	6,9	17	75	3	5	554
MÉDIA		7,3	43,4	14,5	6,5	18,09	73,5	4,9	3,5	636,5
SD		0,3	2,92	0,94	0,44	3,08	2,29	1,75	1,21	62,74



Tabela 37 Parâmetros hematológicos dos ratos wistar machos (1) e fêmeas (0) tratados com solução salina (CS) e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica.

Grupo CS	Rato	Hemácias				Segmentados	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Plaquetas
		milhões/ml	HCT %	HB mg/dl	LG %					
	0	7,6	43	14,2	6,5	18	73	7	2	694
	0	6,8	48	16	6,1	24	69	4	3	666
	0	7,5	45,1	15,1	6,9	19	75	3	3	790
	0	7,5	41,4	13,9	7	17	75	5	3	658
	1	7,3	43,1	14,5	6,8	22	71	5	2	793
	1	7,34	44,12	14,75	6,66	20	72,6	4,8	2,6	720,2
MÉDIA		0,32	2,53	0,83	0,36	2,91	2,61	1,48	0,55	66,45

Tabela 38. Parâmetros hematológicos dos ratos wistar machos (1) e fêmeas (0) tratados com solução salina com 10% de DMSO (CD) e pertencentes ao teste de toxicidade sub-crônica.

Grupo CD	Rato	Hemácias				Segmentados	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Plaquetas
		milhões/ml	HCT %	HB mg/dl	LG %					
	0	7,3	36,1	12,1	6,4	22	70	4	4	768
	0	7,1	37,8	12,5	7,2	17	75	7	1	586
	0	7,3	45,3	15,3	7	20	74	3	3	786
	0	7	44,9	14,9	6,6	15	75	7	3	563
	1	7,6	47,2	15,4	6,2	17	73	5	5	541
	1	7,3	44,3	15,1	7,1	35	61	2	2	620
	1	6,9	46,1	15,5	6,4	24	69	4	3	663
	1	7,5	38,9	12,9	6	21	72	5	2	644
MÉDIA		7,25	42,6	14,2	6,6	21,4	71,1	4,6	2,87	646,4

**Legenda:**

**HCT:** Hematócrito

**HB:** Hemoglobina

**LG:** Leucócitos granulares

**CS:** Controle salina

**CD:** Controle DMSO-salina

**SD:** Desvio-padrão

