



Talidomida reduz a produção de fator de necrose tumoral alfa por macrófagos alveolares

José Luiz Tavares, Aron Wangoo, P. Dilworth,
Ben Marshall, S. Kotecha, Rory Shaw

RESUMO

Acredita-se que a produção abundante de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) por macrófagos alveolares e outras células pode contribuir para o desenvolvimento de dano pulmonar permanente em muitas doenças inflamatórias. Há a necessidade de um agente, sem os efeitos colaterais dos corticosteróides, que possa reduzir a produção de TNF α pelos macrófagos ativados pela doença. Este estudo avaliou o efeito da talidomida na produção de TNF α induzida por lipopolissacarídeo (LPS) pelos macrófagos alveolares obtidos de pacientes com tuberculose e outras doenças associadas com a ativação de macrófagos.

Macrófagos alveolares obtidos de lavado broncoalveolar de 31 pacientes (tuberculose: 12, sarcoidose: 3, câncer de pulmão: 5, bronquite crônica: 5, pneumonia: 6) foram estimulados com LPS isoladamente ou com LPS combinado ou com talidomida ou com dexametasona. TNF α associado à célula, analisado por imunocitoquímica ou TNF α liberado por macrófagos, avaliado pelo método de ELISA, estavam muito aumentados nas células incubadas com LPS ($p < 0,05$) e ambos estavam diminuídos após a adição de talidomida ($p < 0,05$) ou de dexametasona ($p < 0,05$) atingindo níveis semelhantes aos observados quando os macrófagos eram incubados apenas com meio de cultura. Do mesmo modo, a medida do mRNA do TNF α , medido pela hibridização *in situ* (ISH), aumentava após a incubação com LPS ($p < 0,05$) mas este aumento não ocorria quando se adicionava talidomida ($p < 0,05$) ou dexametasona ($p < 0,05$). A capacidade da talidomida em reduzir a produção de TNF α induzida pelo LPS pelos macrófagos alveolares era a mesma tanto nas células de pacientes com tuberculose como dos pacientes com outras doenças.

A capacidade da talidomida em reduzir a produção de TNF α por macrófagos alveolares destes pacientes com pneumopatias em atividade neste experimento sugere que ela, ou seus análogos, possam ter potencial medicamentoso em reduzir a produção de TNF α na doença clínica.

ABSTRACT

Overexuberant production of tumour necrosis factor alpha (TNF α) by macrophages and other cells is thought to contribute to the development of permanent lung damage in many inflammatory conditions. There is a need for an agent, without the side effects of corticosteroids, which can reduce the production of TNF α by macrophages activated by disease. This study evaluated the effect of thalidomide on lipopolysaccharide

(*) Este estudo foi apoiado pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior e pela *British Lung Foundation*. Departamento de Medicina Respiratória, Imperial College of Science, Technology and Medicine - University of London, UK. Artigo recebido para publicação no dia 04/01/1999 e aceito para no dia 06/03/1999, após revisão.

(LPS) induced TNF α production by human alveolar macrophages obtained from patients with tuberculosis and a group of other disease associated with macrophage activation.

Alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage from 31 patients (tuberculosis=12, sarcoidosis=3, lung cancer=5, chronic bronchitis=5, pneumonia=6) were stimulated with LPS alone or LPS in combination with either thalidomide or dexamethasone. Cell associated TNF α , as measured by immunochemistry, and TNF α released by macrophages, as assessed by ELISA, were markedly increased when cells were incubated with LPS ($p < 0,05$) and both were decreased following addition of thalidomide ($p < 0,005$) or dexamethasone ($p < 0,05$) to amounts similar to those observed when macrophages were incubated with medium alone. Similarly, TNF α mRNA as measured by in situ hybridization (ISH) was increased following incubation with LPS ($p < 0,05$) but this increase was prevented by addition of thalidomide ($p < 0,05$) or dexamethasone ($p < 0,05$). The ability of thalidomide to reduce LPS induced TNF α production by alveolar macrophages was the same when cells from patients with tuberculosis and cells from patients with other conditions were compared.

The ability of thalidomide to reduce TNF α production by human alveolar macrophages from patients with active lung disease in this experimental assay suggests that thalidomide and its analogues may have potential as drugs to reduce TNF α production in clinical disease.

Introdução

Acredita-se que o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) derivado de macrófagos alveolares possa ter papel central na patogênese de muitas doenças nas quais a agressão tecidual ocorra como resultado de uma resposta inflamatória aumentada (1-11). A dualidade do papel benéfico e prejudicial do TNF α é bem destacada na tuberculose aonde há evidência de produção local de TNF α (12), assim como aumento da capacidade dos monócitos em produzir TNF α (13,14). Embora a produção do TNF α seja essencial para a morte da micobactéria (12,15-18), ele também pode contribuir para a perda de peso e outras manifestações clínicas da doença (14). Além de promover resposta inflamatória, há evidência de que o TNF α seja essencial para a progressão da inflamação à fibrose (6,19,20), um modelo observado nas doenças pulmonares crônicas. Em modelos animais de injúria pulmonar, a reação fibrótica é quase completamente evitada pela administração de anticorpos anti-TNF α e é significativamente aumentada pela infusão contínua de TNF α recombinante (3,5).

Na pesquisa de agentes terapêuticos para reduzir o TNF α , várias drogas tem sido avaliadas. Os corticosteróides reduzem a quantidade de TNF α liberado por macrófagos alveolares humanos (4, 21, 22) mas devem ser dados antes do estímulo desencadeante e o efeito pode ser estímulo-dependente (23), o que poderia explicar os efeitos variáveis dos corticosteróides em algumas doenças. A

talidomida (alpha-N-phthalyl-imino-ácido glutâmico) tem sido usado como agente antiinflamatório e imunossupressivo na doença reumatóide, lupus eritematoso discóide e doença enxerto-hospedeiro (24-27). Atualmente, ela é usada na terapêutica do eritema nodoso da hanseníase, um estado inflamatório agudo que ocorre na lepra lepromatosa associada com a produção de TNF α , aonde se observa que as concentrações de TNF α no soro são reduzidas após o tratamento destes pacientes com talidomida (25). Sabe-se que a talidomida inibe a síntese da proteína do TNF α aumentando a degradação do mRNA do TNF α (8,27). Uma vantagem adicional da talidomida poderia ser o fato de que a droga pode ser efetiva mesmo quando dada após o estímulo celular ocorrer.

Neste estudo, questionamos se a talidomida seria tão eficaz quanto os corticosteróides na redução da produção de TNF α pelos macrófagos alveolares obtidos de pacientes com diferentes doenças pulmonares, em particular a tuberculose, na qual a produção de TNF α pelos macrófagos alveolares está aumentada (19).

Material e métodos

Foram estudados pacientes com doença pulmonar submetidos a broncoscopia diagnóstica. A avaliação incluía radiografia de tórax e broncoscopia com lavado broncoalveolar. Os pacientes foram informados do estudo e deram seu consentimento quanto à sua participação. Este estudo foi

aprovado pela Comissão de Ética da instituição aonde foi realizado.

Lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar (LBA) foi realizado por técnica padrão usando broncofibroscópio Olympus BF P20D. Atropina com ou sem midazolam era usada como pré medicação. Lidocaína (2%) era aplicada como anestésico local. A broncoscopia era realizada na posição semi ereta com oxigênio suplementar quando necessário. Após a inspeção do orifício segmentar, a ponta do broncofibroscópio era encunhada no orifício segmentar do lobo médio. Solução salina em temperatura ambiente era instilada em aliquotas de 50mL até o total de 200mL. O fluido era então coletado e as alíquotas eram reunidas em um frasco plástico de 500mL e colocado em gelo.

Isolamento e estímulo de macrófagos alveolares

Após centrifugação (1.000rpm, 10 minutos) à temperatura ambiente, as células do LBA eram ressuspendidas em meio RPMI 1640 contendo 5mM de tampão Hepes (Gibco BRL, UK), 100 U/mL de penicilina, 100mg/mL de estreptomicina (Gibco BRL, UK) e 2 mM de glutamina (Gibco BRL, UK) até uma concentração final de 1×10^6 células/mL. As células eram então incubadas a 37°C e 5% CO₂ em lâminas de vidro acopladas a câmaras de cultura de tecidos (LabTek, Nunc Inc, USA) por 2 horas. Células não aderentes eram removidas por lavagens seqüenciais com meio RPMI 1640. Meio de cultura contendo 100 U/mL de penicilina, 100 mm/mL de estreptomicina, 2mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino era então adicionado aos macrófagos aderidos à lâmina de vidro. A seguir, as células eram então estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS *Escherichia coli* 026: B6, Sigma Chemical Co., Dorset, UK) diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) em concentrações de 1 ou 10 mm/mL (25). Dexametasona (Sigma Chemical Co.) em concentração 1mM/mL (31) ou talidomida (Penn Pharm Ltd., Gwent, UK) na concentração 4mg/mL (25) era então adicionada às células estimuladas com LPS. Estas culturas celulares eram incubadas a 37°C com 5% CO₂ durante 24 ou 48 horas. A viabilidade celular era testada pela exclusão do azul triptan seguindo as recomendações do fabricante (Sigma Chemical Co.) tendo 90% como limite de aceitação.

Avaliação do TNF α

Após 24 ou 48 horas de cultura, o sobrenadante era coletado e estocado a -20°C para ensaio com ELISA. As lâminas eram secas ao ar ambiente, fixadas ou com acetona para imunocitoquímica para detectar o TNF α ligado à membrana celular ou com paraformaldeído a 4% para hibridização *in situ* e estocadas a -80°C.

Avaliação do TNF α por imunocitoquímica

As lâminas estocadas a -80°C eram descongeladas, secas ao ar ambiente, fixadas com acetona e lavadas com PBS (pH 7,2). A ligação proteica inespecífica era bloqueada com soro de coelho (Dako Ltd., Bucks, UK) 1:10 em PBS. Anticorpo primário usado neste estudo era o anti-TNF α (TCS Biologicals Ltd., Buckingham, UK) diluído a 1:100 em soro de coelho em PBS. As lâminas eram incubadas *overnight* em uma câmara úmida a 4°C. A seguir, as lâminas eram lavadas com PBS e então incubadas com solução de peróxido de hidrogênio e metanol a 3%. Após lavagem com PBS, as lâminas eram então incubadas com anticorpo secundário (camundongo anti coelho, Dako, Ltd.) por uma hora a temperatura ambiente, lavadas com PBS, incubadas com complexo peroxidase avidina-biotina (Dako Ltd.) por 30 minutos em temperatura ambiente, lavados com PBS e então visualizados com diaminobenzidina (Dako, Ltd.). A seguir, as lâminas eram coradas com solução de hematoxilina de Mayer (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) por um minuto. Após lavar e secar à temperatura ambiente, as lâminas eram analisadas contando-se o número de macrófagos positivos (corados pelo TNF α). Pelo menos 100 macrófagos eram contados em cada condição do experimento e os resultados eram expressos em percentual. Nas lâminas controle a etapa do anticorpo primário era omitida. As lâminas eram codificadas e examinadas sem conhecimento do código usado.

Avaliação do TNF α pelo método de ELISA

A concentração da proteína TNF α no sobrenadante era determinada pelo método de ELISA (Human TNF Quantikine, R&D Systems, Oxon, UK) sendo a densidade óptica das lâminas determinada, em duplicata, pelo leitor automático de placas (Dynatech Lab Ltd., Sussex, UK). Os valores-padrão eram analisados *versus* a concentração dos mesmos padrões e a melhor curva era obtida. Os dados eram linearizados usando-se

análise de regressão e apresentados como mg/mL. Utilizou-se equação de regressão linear para determinar a concentração de TNF α em cada amostra.

Análise do mRNA do TNF α por hibridização in situ

As lâminas eram descongeladas, lavadas em PBS, mergulhadas em solução de paraformaldeído a 4%, lavadas novamente em PBS seguindo-se de acetilação com 0,1% de anidrido acético em solução 0,1M de trietanolamina para reduzir a interação inespecífica entre as sondas de DNA e o tecido. As lâminas eram então lavadas com PBS, secas à temperatura ambiente e usadas para hibridização no mesmo dia. Foi utilizado um coquetel de sondas de TNF α humano (R&D Systems, UK). A reação de marcação consistia de 5mL de oligonucleotídeos, 6mL de deoxinucleotídeo transferase terminal (Amersham), 4mL de tampão, 7mL de 35-S (dATP) (ICN Biomedicals) e 18mL de água destilada para fazer o total de 40mL. A reação era incubada a 37°C por uma hora e sondas marcadas eram purificadas usando kit de purificação de 20 ácidos nucléicos (Nen DuPont Ltd., UK), de acordo com as recomendações do fabricante. As lâminas eram cobertas durante tres horas com 400mL de solução pré hibridização que consistia em solução a 50% de formamida (Sigma), 1mL de solução de Denhardt, 0,5mL de ácido tetracético diaminoetileno (EDTA) a 0,1 M, 100mg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado, 250mg/mL de t-RNA, 10mM de tampão fosfato, dextran a 10% e tampão citrato de sódio/cloreto de sódio 20X. Antes de ser utilizada, a solução deve ser aquecida até ferver por 5 minutos, a seguir colocar em gelo e adicionar 250mg/mL de ácido poliadenílico e 10mM de ditiotreitol. A solução pré hibridização era removida após tres horas e a solução de hibridização era colocada nas lâminas. Solução de hibridização era preparada diluindo sonda marcada com S-35 em solução de pré hibridização para atingir entre 20 e 30 x 10 contagens/mL. Hibridização era realizada *overnight* em 37°C. Após incubação, as lâminas eram lavadas usando SSC nas seguintes concentrações: 2x SSC por uma hora em temperatura ambiente, 1x SSC por uma hora em temperatura ambiente, 1x SSC por trinta minutos a 37°C e, finalmente, 1xSSC durante trinta minutos em temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas eram secas

no ar ambiente e mergulhadas em emulsão nuclear Ilford (Ilford Ltd., Cheshire, UK). Duas semanas após, as lâminas eram reveladas em Phenisól (Ilford Ltd.), mergulhadas em ácido acético glacial a 1% e solução de glicerol a 1% para interromper a reação de revelação, fixadas em solução 0,3moL/L de tiosulfato de sódio (BDH Ltd., Dorset, UK), lavadas em água destilada, coradas com hematoxilina de Mayer (Sigma) e montadas com lamínula. Os resultados eram quantificados usando método reconhecido de contagem de pontos negros/célula em 20 macrófagos alveolares ao acaso (20). Para corroborar este resultado, um segundo método de contagem era feito no qual o número de macrófagos com mais do que 10 pontos negros, em um total de 50 macrófagos alveolares, era identificado. Para casos-controle, algumas lâminas eram tratadas com Rnase antes de se adicionar sonda arcada com TNF α . As lâminas eram codificadas e examinadas sem conhecimento do código do experimento.

Análise estatística

Os dados obtidos são apresentados como valores médios +/- erro padrão. A comparação entre os grupos era realizada pelo Teste de Wilcoxon. Um valor $p < 0,005$ era considerado como significativo.

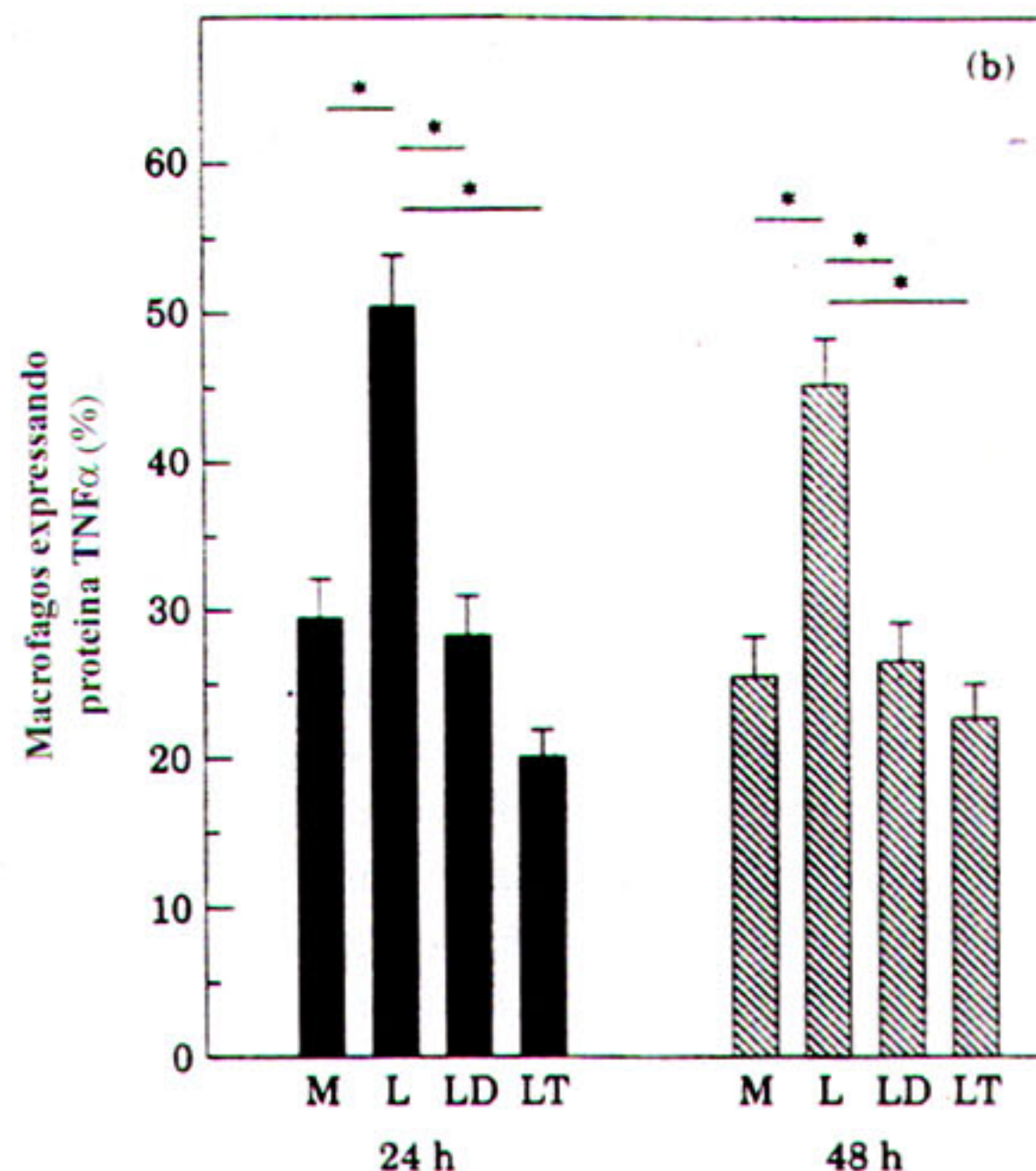
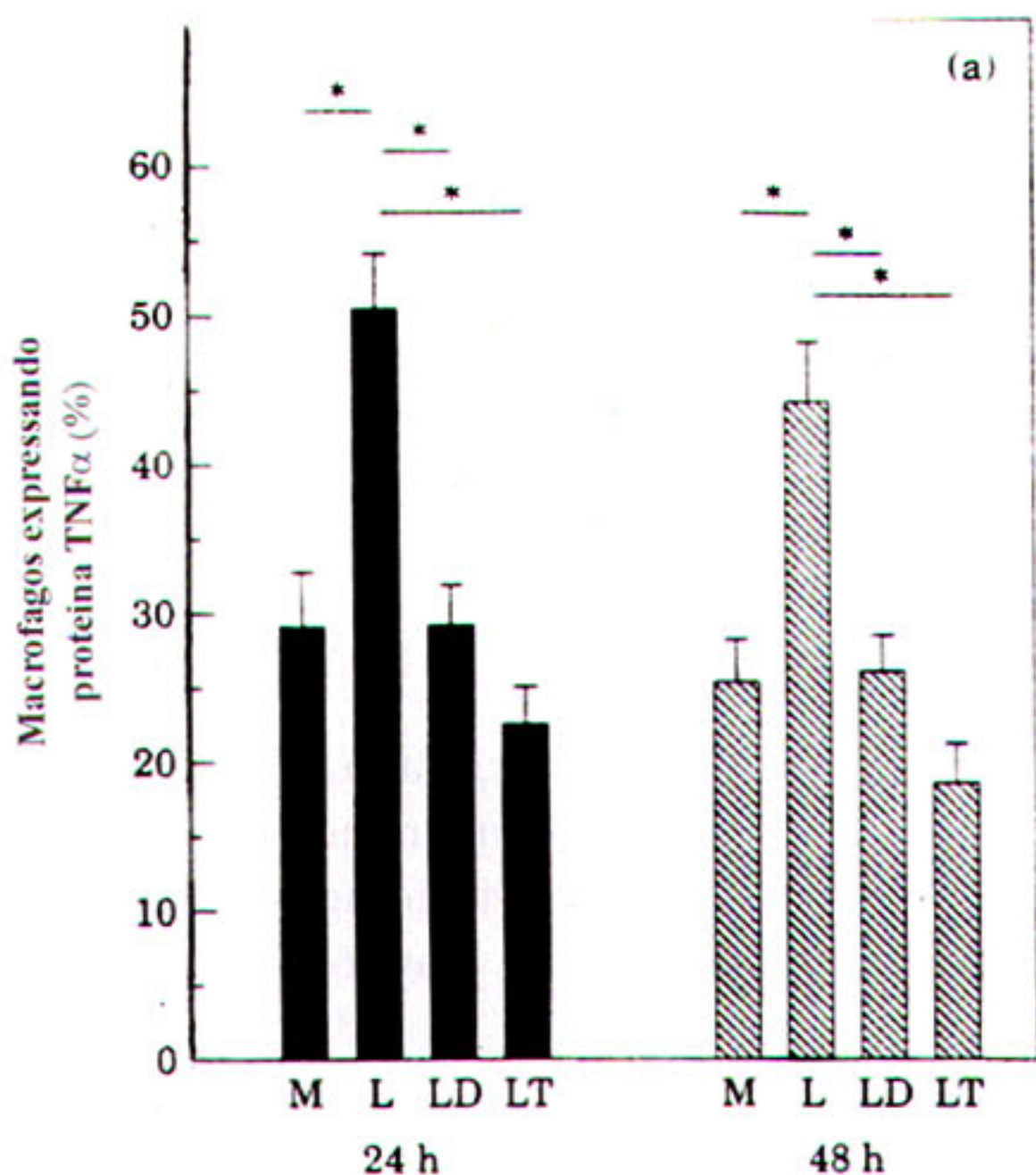
Resultados

Trinta e um pacientes (tabela 1) com pneumopatias associadas a condições inflamatórias pulmonares ou de vias aéreas (média de idade: 49 anos, faixa de variação: 22 a 81 anos, 20 homens e 11 mulheres, 17 fumantes e 14 não fumantes) foram estudados.

Inicialmente, os resultados foram considerados em conjunto, independente da etiologia da doença pulmonar. Após a cultura por 24 ou 48 horas com LPS a 1mg/mL ou 10mg/mL (Figura 1a, 1b), havia um aumento do TNF α associado à célula verificando-se aumento significativo no número de macrófagos corados positivamente com anticorpo anti-TNF α quando comparados às células incubadas com meio de cultura isoladamente ($p < 0,05$). A adição de dexametasona ou talidomida causou significativa redução no aumento de células coradas pelo TNF α secundariamente ao estímulo com LPS. Tal redução foi tão intensa na presença de dexametasona ou talidomida que a imunomarcação foi semelhante à verificada nas células incubadas apenas com meio de cultura ($p < 0,05$). Notamos resultados se-

Figura 1a e 1b:

Percentual de macrófagos alveolares corados com anticorpo anti-TNF α após incubação por 24 ou 48 horas com meio de cultura apenas (M), lipopolissacarídeo LPS (L) nas concentrações 1 μ g/mL (Figura 1a) ou 10 μ g/mL (Figura 1b), LPS com dexametasona (LD) ou LPS com talidomida (LT). (* = p<0,05).



melhantes tanto quando o LPS era usado em concentração de 1 como de 10mg/mL e, também, quando as células eram incubadas por 24 ou por 48 horas.

Resultados semelhantes foram observados quando analisamos o TNF α secretado nos sobrenadantes das culturas, medido pelo método de ELISA (Figura 2). A incubação de macrófagos com LPS por 24 horas determinou o aumento significativo da produção de TNF α (p<0,05) e a adição de dexametasona ou talidomida às células incubadas com LPS determinou a redução significativa da produção de TNF α (p<0,05) para níveis semelhantes às concentrações verificadas no sobrenadante de células cultivadas apenas com meio de cultura.

Os resultados das medidas do mRNA do TNF α foram semelhantes aos obtidos pela medida da proteína TNF α pelo método de ELISA. Por ambos os métodos de contagem (ou o número de pontos negros/célula em 20 células ao acaso - figura 3a - ou o número de células com mais do que 10 pontos negros - figura 3b), um significativo aumento da expressão do mRNA do TNF α foi observado quando as células foram incubadas com LPS a 1mg/mL por 24 horas quando comparadas às células incubadas apenas com meio de cultura (p<0,05). A adição de dexametasona ou

talidomida às culturas celulares reduziu significativamente a expressão do mRNA do TNF α a níveis semelhantes ao observado em células incubadas apenas com meio de cultura (p<0,05). A metodologia utilizada discriminava o sinal do

Figura 2:

Concentração da proteína TNF α secretada por macrófagos alveolares após incubação por 24 horas com meio de cultura apenas (M), lipopolissacarídeo LPS (LPS) na concentração 1mg/mL, LPS com dexametasona (LPS+DEX) ou LPS com talidomida (LPS+THAL). (* = p<0,05).

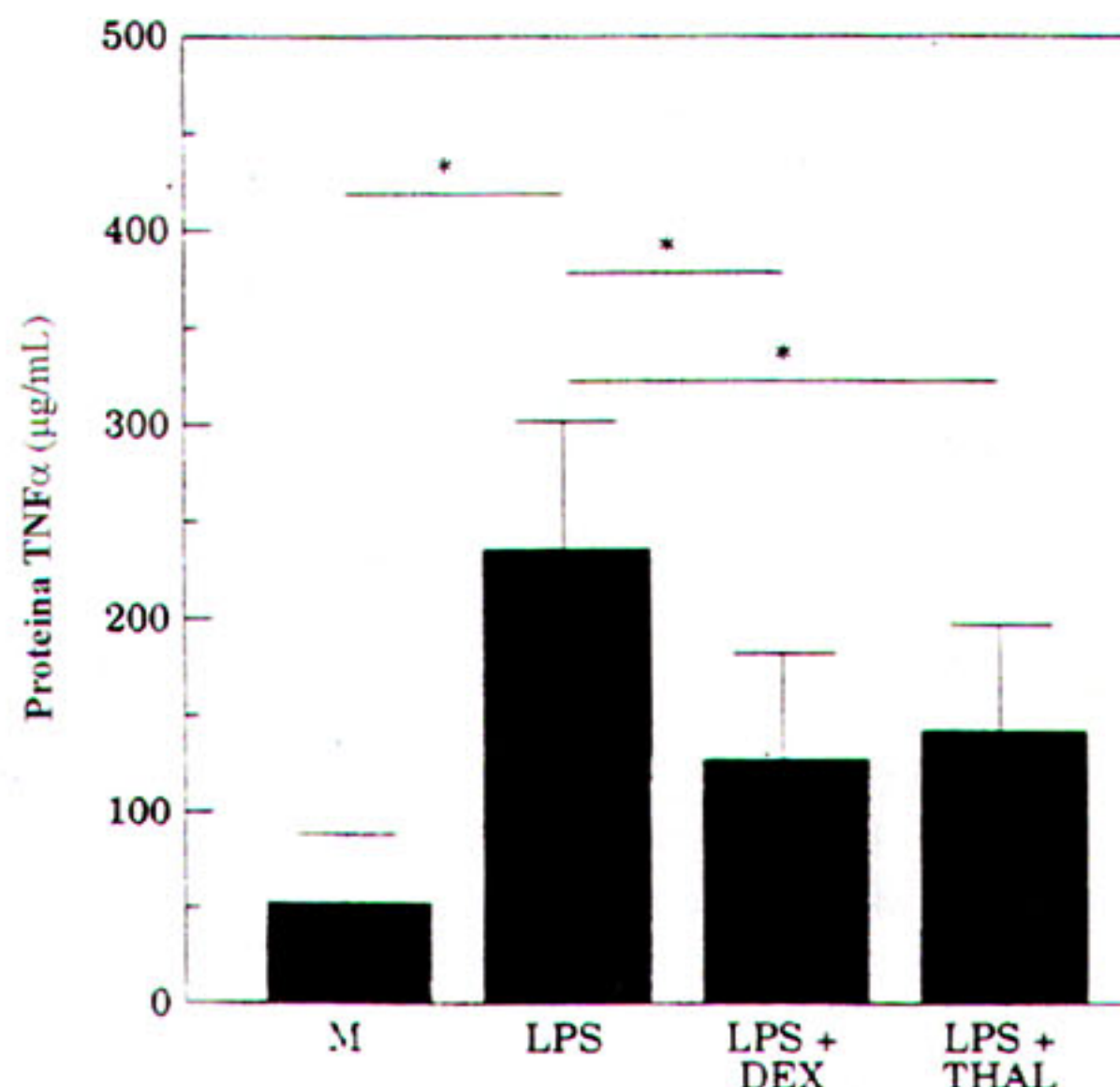


Tabela 1
Características dos Pacientes Estudados

Diagnóstico	Nº de pacientes	sexo (M/F)	Média de idade (anos)	tabagismo (S/N)
Tuberculose	12	9/3	41	4/8
Sarcoidose	3	1/2	38	0/3
Câncer de Pulmão	5	2/3	65	5/0
Bronquite Crônica	5	4/1	58	5/0
Pneumonia	6	4/2	49	4/2
Total	31	20/11	49	17/14

mRNA do TNF α das partículas de macrófagos de fumantes e não fumantes. Não havia diferença significativa na expressão do mRNA do TNF α de macrófagos incubados apenas com meio de cultura por 24 horas quando as células de fumantes eram comparadas às de não fumantes, tanto pelo método de número de pontos negros por célula em 20 células ao acaso como pelo número de células com mais de 10 pontos negros ($p > 0,05$).

Quando resultados de pacientes com tuberculose ou com outros diagnósticos eram comparados havia aumento significativo, após o tratamento das culturas com LPS, do número de macrófagos corando positivamente (Figura 4a) com anticorpos para TNF α ($P < 0,05$) assim como aumento da expressão do mRNA do TNF α (Figura 4b) pelos macrófagos alveolares ($p < 0,05$) em ambos os grupos de pacientes. Do mesmo modo, a adição de dexametasona ou de talidomida determinou a redução significativa do número de macrófagos corando positivamente com anticorpos anti-TNF α (Figura 4a) ($p < 0,05$) e da expressão do mRNA do TNF α por estas células (Figura 4b) ($p < 0,05$). Esta resposta à dexametasona ou à talidomida era similar em pacientes com tuberculose ou com outros diagnósticos.

Discussão

A principal observação deste estudo foi que a talidomida reduziu a produção de TNF α induzida pelo estímulo com LPS pelos macrófagos alveolares em pacientes com pneumopatias associadas a alterações inflamatórias. A talidomida mostrou ser tão eficaz quanto a dexametasona na redução da produção do TNF α pelos macrófagos alveolares, independente do diagnóstico envolvido. Este estudo amplia observações prévias (25) de que a talidomida reduz a produção de TNF α por

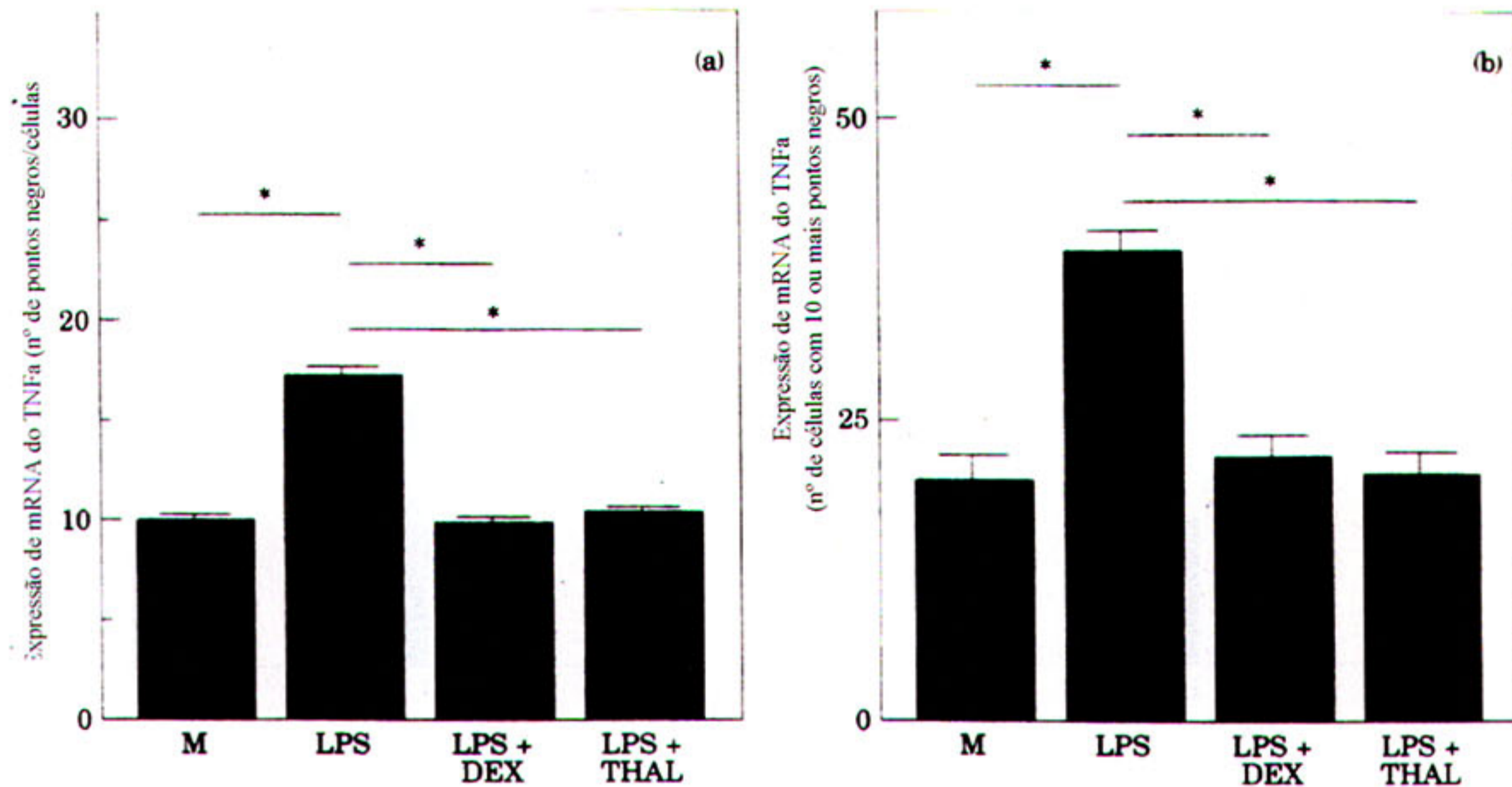
monócitos do sangue periférico de voluntários normais tratados com LPS.

No presente estudo, macrófagos alveolares foram obtidos de pacientes com pneumopatias diversas incluindo tuberculose. Macrófagos de todos os pacientes, independente do diagnóstico, apresentaram resposta semelhante à talidomida. A presença de reações inflamatórias no aparelho respiratório destes pacientes deve ter atuado como estímulo para a produção de TNF α pelos macrófagos alveolares (13-16,18). Sabe-se que a tuberculose está associada à produção de TNF α . Desde que resultados semelhantes foram observados, neste trabalho, em portadores de tuberculose e portadores de outras pneumopatias, é possível que a talidomida seja efetiva na prevenção do aumento do TNF α secretado pelos macrófagos induzido pelo LPS de modo geral, sem relação com a etiologia específica envolvida.

Para confirmar que o efeito da talidomida se faz ao nível da proteína secretada, da proteína ainda não secretada e do mRNA, a combinação dos métodos de ELISA (Figura 2), imunocitoquímica (Figura 1a e 1b) e hibridização *in situ* (Figura 3a e Figura 3b) foram, respectivamente, usadas. O efeito da talidomida foi observado em diferentes concentrações de LPS e diferentes períodos de incubação celular, no qual a talidomida foi eficaz quando adicionada a células estimuladas com LPS a 1 ou 10mg/mL e incubadas por 24 ou 48 horas. Um possível comprometimento dos resultados, principalmente quando analisados sob o método de hibridização *in situ*, seria a presença de partículas nos macrófagos alveolares de fumantes. Entretanto, contagens de sinais de hibridização em células de fumantes e de não fumantes eram similares, indicando que tal interferência na análise não foi verificada neste experimento.

Figura 3a e 3b:

Expressão de mRNA de TNF α por macrófagos alveolares após incubação por 24 horas com meio de cultura apenas (M), lipopolissacarídeo LPS (LPS) na concentração 1mg/mL, LPS com dexametasona (LPS+DEX) ou LPS com talidomida (LPS+THAL). Os resultados foram quantificados pela contagem tanto pelo número de pontos negros/célula em 20 células ao acaso (Figura 3a) como pelo número de células com 10 ou mais pontos negros no total de 50 células (Figura 3b). (* = p<0,05).



Embora muitos estímulos determinem a liberação de TNF α pelos macrófagos, como por exemplo a presença de interferon γ , interleucina 2, fagocitose, união de complexos imunes, partículas virais e componentes do *Mycobacterium tuberculosis* (12,13,18,28), no presente estudo, o estímulo padrão com LPS bacteriano foi usado como agonista para promover produção de TNF α . O aumento de TNF α foi notado tanto ao nível da proteína como do mRNA e, assim, tal experimento serviu para avaliação de efeitos farmacológicos.

A talidomida foi inicialmente usada em 1953 como anticonvulsivante mas foi abandonada por ser teratogênica (24, 29). A talidomida é um potente agente imunossupressivo que causa redução da proliferação de monócitos do sangue periférico e da quimiotaxia de neutrófilos, induzidas por mitógenos (30) Além disso a talidomida reduz a expressão de marcadores de superfície de monócitos assim como e moléculas de adesão de linfócitos, monócitos e granulócitos (30) além de inibir a produção de TNF α por células mononucleares (14,25,27). Esta inibição da produção de TNF α pela talidomida depende do estado de estimulação celular (25) e é reduzida se a talidomida é retirada antes da indução pelo TNF α (8). Estudos de cinética com monócitos do sangue periférico estimulados por LPS mostraram que a

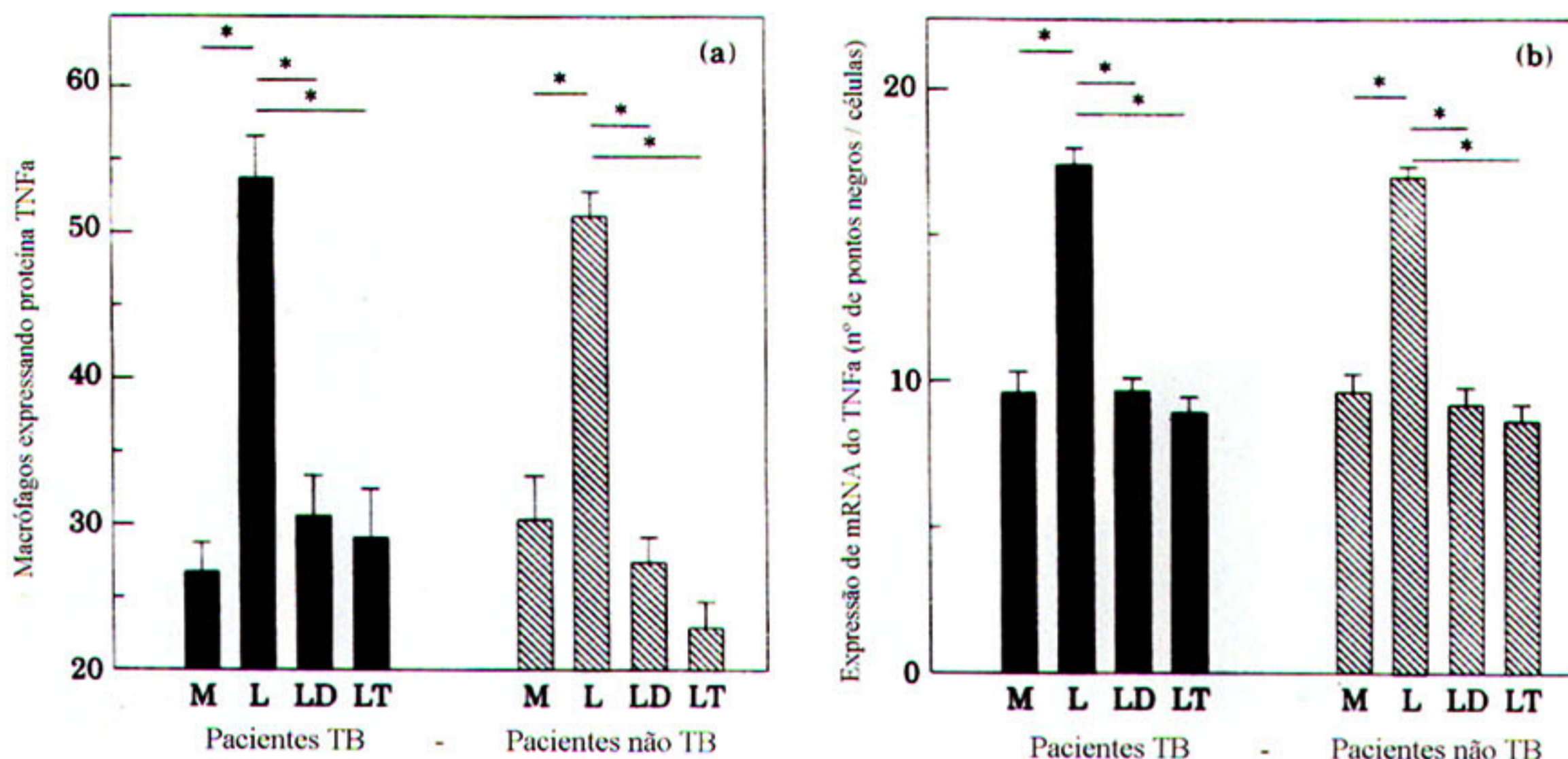
talidomida reduziu a produção de TNF α quando adicionada algumas horas após a estimulação pelo LPS, levantando a possibilidade que a talidomida atue ao nível pós-transcrição acelerando a degradação dos produtos transcritos de TNF α (26). Em comparação com a talidomida, os corticosteróides apresentam mecanismo de ação diferente no que se refere à produção do TNF α , atuando por inibição leve do acúmulo de mRNA do TNF α e inibição acentuada da tradução dos transcritos de mRNA do TNF α (31). Foi sugerido que a dexametasona pode ter alguma ação no receptor de LPS ou em alguma proteína envolvida na resposta (31). No presente estudo tanto a talidomida como a dexametasona foram eficazes na redução da produção do TNF α , embora o mecanismo exato não tenha sido investigado.

Este estudo não mediu concentrações de outras citocinas além do TNF α . Entretanto, o TNF α é reconhecidamente capaz de modular outros mediadores inflamatórios e sua inibição pode levar à redução de outras moléculas que, *in vivo*, podem modular a reação inflamatória (27).

Além disso, o TNF α pode ter importante papel *in vivo* na resistência do hospedeiro às infecções assim como em doenças malignas (32), sugerindo a questão do desenvolvimento de drogas que reduzam se inibir totalmente a produção do TNF α .

Figura 4a e 4b

Na figura 4a se observa o percentual de macrófagos corados com anticorpo anti-TNF α e, na figura 4b, se observa a expressão de mRNA do TNF α pelos macrófagos alveolares e pacientes com ou sem tuberculose (TB) após incubação por 24 horas com meio de cultura apenas (M), lipopolissacarídeo LPS (L) na concentração 1mg/mL, LPS com dexametasona (LD) ou LPS com talidomida (LT). (* = p<0,05).



Sabe-se que as concentrações de talidomida usadas neste estudo são similares às concentrações plasmáticas obtidas no homem após a administração de dose oral única de 150mg de talidomida, que é uma dose que tem se mostrado ser eficaz na redução do eritema nodoso em pacientes com hanseníase (25).

Sob a perspectiva clínica, este estudo forneceu dados mostrando que a talidomida, em concentrações terapêuticas, pode reduzir a produção de TNF α pelos macrófagos alveolares a um nível semelhante ao que se verifica pela utilização de corticosteróides. Esta verificação pode sugerir a necessidade de se desenvolver novos agentes que atuem na redução da produção de TNF α . Tal perspectiva poderia oferecer alguma vantagem sobre o uso dos corticosteróides no tratamento das pneumopatias inflamatórias crônicas, incluindo a tuberculose, nas quais o TNF α contribui para a patogênese.

Referências Bibliográficas

References

1-Vilcek J, Palombela V, Henriksen L, et al. Fibroblast growth enhancing activity on tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 1986; 163: 632-643.

2-Elias J, Krol R, Fuendlich B, Sampson P. Regulation of human lung fibroblast glycosaminoglycan production by recombinant interferons, tumor necrosis factor and lymphotoxin. *J Clin Invest* 1988; 81: 325-330.

3-Piguet P, Collart M, Grau G, Kapanci Y, Vassali P. Tumor necrosis factor/cachetin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J Exp Med* 1989; 170: 655-663.

4-Baughman P, Lower E. The effect of corticosteroids on methotrexate therapy on lung lymphocytes and macrophages in sarcoidosis. *Am Rev Resp Dis* 1990; 142: 1268-1271.

5-Piguet P, Collart M, Grau E, Sappino A, Vassali P. Requirement of tumor necrosis factor for development of induced pulmonary fibrosis. *Nature* 1990; 344: 245-247.

6-Semenzato G. Tumor necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. *Br J Cancer* 1990; 61: 354-361.

7-Cembrzynska M, Szlarcz E, Inglot A, Teodorczyk J. Elevated release of tumor necrosis factor alfa and interferon gamma by bronchoalveolar lavage leukocytes from patients with bronchial asthma. *Am Rev Resp Dis* 1993; 147: 291-295.

8-Manonkawkeyoon S, Probe R, Moreira A, Schauf V, Kaplan G. Thalidomide inhibits the replication of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 5974-5978.

9-Keatings V, Coulby L, Barnes P, O'Connor B. Increased tumor necrosis factor alfa concentrates in induced

- sputum following the late asthmatic response. *Eur Respir J* 1995; 8 (Suppl. 19): 471.
- 10-Pantelidis P, Southcott A, Du Bois R. Cytokine expression in fibrosing alveolitis; differential alveolar macrophage regulation. *Eur Respir J* 1995; 8 (Suppl. 19): 547.
- 11-Zheng L, Marques L, Teschler H, Bauer P, Guzman J, Costabel U. Involvement of CD 14 in spontaneous release of TNF alfa, IL-1 beta and IL-6 by alveolar macrophages in sarcoidosis. *Eur Respir J* 1995; 8 (Suppl. 19): 339.
- 12-Barnes PF, Fong SJ, Brennan PJ, Twomey PE, Mazumder A, Modlin RL. Local production of tumor necrosis factor and IFN gamma in tuberculous pleuritis. *J Immunol* 1990; 145: 149-154.
- 13-Schauf V, Rom W, Smith K et al. Cytokine gene activation and modified responsiveness to interleukin-2 in the blood of tuberculosis patients. *J Infect Dis* 1993; 168: 1056-1059.
- 14-Kaplan G. Cytokine regulation of disease progression in leprosy and tuberculosis. *Immunobiol* 1994; 191: 546-568.
- 15-Rook G, Taverne J, Leveron C, Steele J. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology* 1987; 62: 229-234.
- 16-Kindler V, Sappino A, Grau G, Piguat P, Vassali P. The inducing role of tumour necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989; 56: 731-740.
- 17-Appelberg R, Orme I, Pinto de Souza M, Silva M. In vitro effects of interleukin 4 on interferon gamma induced macrophage activation. *Immunology* 1992; 76: 553-559.
- 18-Wallis R, Ellner J. Cytokines and tuberculosis. *J Leuk Biol* 1994; 55: 676-681.
- 19-Ogawa T, Uchida H, Kusumoto Y, Mori Y, Yamamura Y, Hamada S. Increase in tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 secreting cells in peripheral blood mononuclear cells from subjects infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1991; 59: 3021-3025.
- 20-Strieter R, Remick D, Lynch J, Spengler R, Kunkel S. Interleukin 2-induced tumor necrosis factor alpha gene expression in human alveolar macrophages and blood monocytes. *Am Rev Resp Dis* 1989; 139: 335-342.
- 21-Gossel T, Perez T, Lassale P, Duquesnoy B, Farre J, Tonnel A. Increased tumor necrosis factor alfa secretion by alveolar macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Am Rev Resp Dis* 1991; 143: 593-597.
- 22-Murch S, MacDonald T, Wood L, Costelove K. Tumor necrosis factor in the bronchoalveolar secretion of infants with the respiratory distress syndrome and the effect of dexamethasone treatment. *Thorax* 1992; 47: 44-47.
- 23-Debets J, Ruers T, Van der Linden M, Van der Linden C, Bunman W. Inhibitory effect of corticosteroids on the secretion of tumor necrosis factor by monocytes is dependent on the stimulus including TNF synthesis. *Clin Exp Immunol* 1989; 78: 224-229.
- 24-Randall T. Thalidomide has 37-year history. *JAMA* 1990; 263: 1474.
- 25-Sampaio E, Sarno E, Galilly R, Cohn Z, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991; 173: 699-703.
- 26-Sarno E, Grau G, Vieira L, Nery J. Serum levels of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol* 1991; 84: 103-108.
- 27-Moreira A, Sampaio E, Zmvidzinas A, Frindt P, Smith K, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993; 177: 1675-1680.
- 28-Cadranel J, Philippe C, Philippe B, et al. Increased expression and occupancy of receptors for tumour necrosis factor on blood monocytes from tuberculous patients. *Clin Exp Immunol* 1993; 94: 51-56.
- 29-Randall T. Thalidomide's back in the news but in more favorable circumstances. *JAMA* 1990; 263: 1467-1468.
- 30-McHugh S, Rifkin I, Deighton J, et al. The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Clin Exp Immunol* 1995; 99: 160-167.
- 31-Han J, Thompson P, Beutler B. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J Exp Med* 1990; 172: 391-394.
- 32-Tracey K. TNF and Mae West or: death from too much of a good thing. *Lancet* 1995; 345: 75-76.



Programação Científica da SOPTERJ

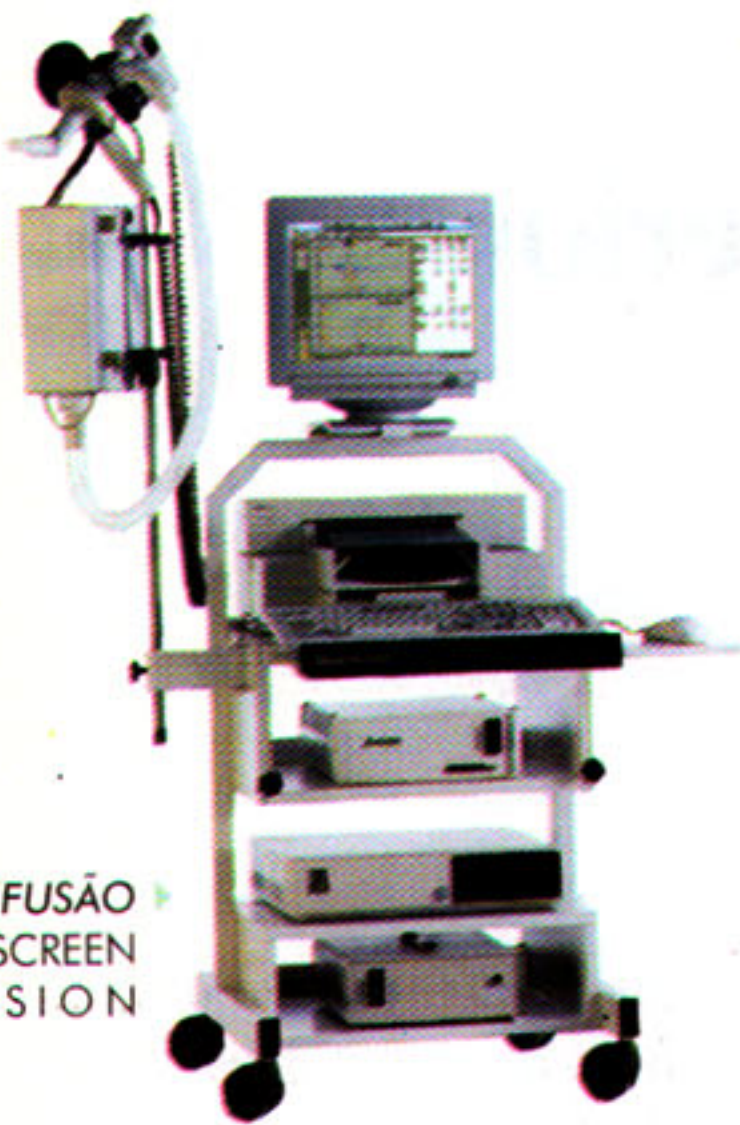
DATA	HORÁRIO	LOCAL	ASSUNTO
22/02	20h30	Barra do Pirai	Relatores: Dr. Jacyr Abbud Filho e Dr. Pedro Cezar Fagundes Coordenador: Dr. Marcílio de Almeida Reis
6/03	9h às 11h	Auditório da Clínica Sorocaba	Casos clínicos Pneumologia em Terapia Intensiva: Prevenção da pneumonia nosocomial e do ventilador Monitoração respiratória do paciente crítico
29/03	19h30	Valença - Anfiteatro da Faculdade de Medicina de Valença	Relatores: Dr. Décio Silva Horta Jr. e Dr. Jaime Veras Correia Coordenador: Dr. Jacyr Abbud Filho
10/04	9h às 11h	Cabo Frio	Casos clínicos Clínica Pneumológica: Tosse crônica: diagnóstico e tratamento Antibioticoterapia na sepsis brônquica crônica
26/04	20h30	Volta Redonda - Auditório Hospital São João Batista	Relatores: Dr. Luiz Paulo Tostes Coimbra e Dr. Lincoln Pereira Coordenador: Dr. Jaime Veras Correia
08/05	9h às 11h	Auditório da Clínica Sorocaba	Casos clínicos Pneumologia pediátrica: Pneumopatias na criança com SIDA: epidemiologia e apresentação clínica Seqüelas crônicas das doenças respiratórias da infância
31/05	20h30	Resende - Centro de Estudos da Santa Casa de Resende	Relatores: Dr. Marcílio de Almeida Reis e Dr. Vitório M. Puntel Coordenador: Dr. Evaldo Araújo Salgado
05/06	9h às 11h	Barra Mansa/Penedo	Casos clínicos Carcinoma brônquico: Novo estadiamento do Carcinoma Brônquico e seus respectivos prognósticos Quimioterapia no Carcinoma Brônquico nas pequenas células
28/06	20h30	Barra Mansa - Centro de Estudos da Santa Casa de Barra Mansa	Relatores: Drs. Pedro Telésforo e Cleide Oliveira Souza e Silva Coordenador: Dr. Pedro Cezar Fagundes
03/07	9h às 11h	Auditório da Clínica Sorocaba	Casos clínicos Pneumologia em SIDA: Pneumopatias no adulto com SIDA: epidemiologia e apresentações clínicas; Novos tratamentos da PCP
07/08	9h às 11h	Itaperuna	Casos clínicos Cirurgia torácica: Indicações da videotoracoscopia Evolução funcional no pós-operatório imediato e tardio da pneumoplastia redutora
11/09	9h às 11h	Auditório da Clínica Sorocaba	Casos clínicos Pneumologia clínica: Vasculites Pulmonares: epidemiologia, classificação e diagnóstico Pneumonite de hipersensibilidade: epidemiologia, classificação e diagnóstico
08/10	9h às 11h	Petrópolis	Casos clínicos Broncoscopia: Papel da broncoscopia para o diagnóstico, estadiamento e tratamento do Carcinoma Brônquico Papel da broncoscopia na UTI
13/11	9h às 11h	Auditório da Clínica Sorocaba	Casos clínicos Métodos de imagem em pneumologia: TC no diagnóstico das doenças do tórax RNM no diagnóstico das doenças do tórax

Jornada de Endoscopia Respiratória

12/05 (Quarta-feira), de 8 às 17h • Coordenação: Dr. Valmir Sangalli Lucas

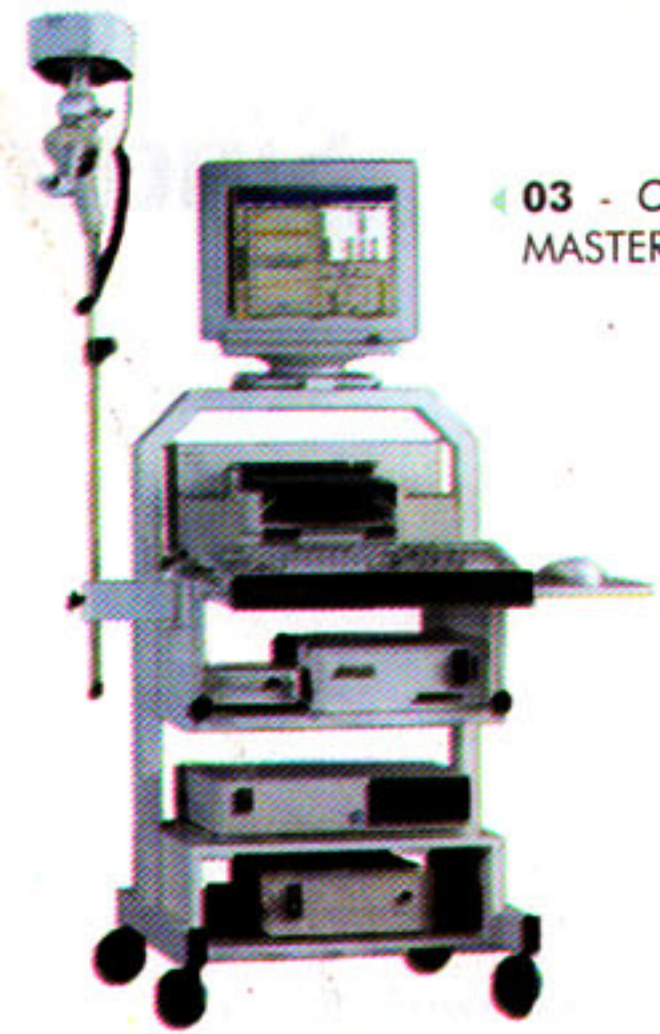
DIFUSÃO, PLESTISMOGRAFIA e OSCILOMETRIA COM QUALIDADE GARANTIDA TEM QUE SER :

JAEGER



01 - DIFUSÃO
MASTERSCREEN
DIFFUSION

02 - PLESTISMOGRAFIA
MASTERSCREEN - BODY



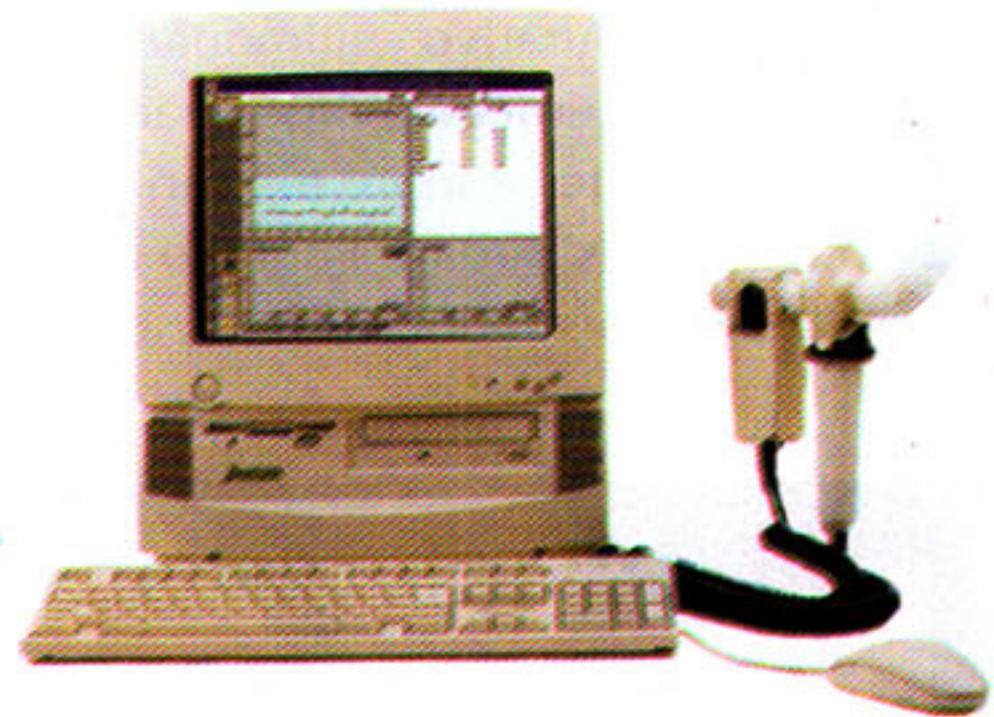
03 - OSCILOMETRIA
MASTERSCREEN - IOS

ESPIRÔMETROS DE ALTA PERFORMANCE QUE COM CERTEZA ATENDERÃO AS SUAS NECESSIDADES.



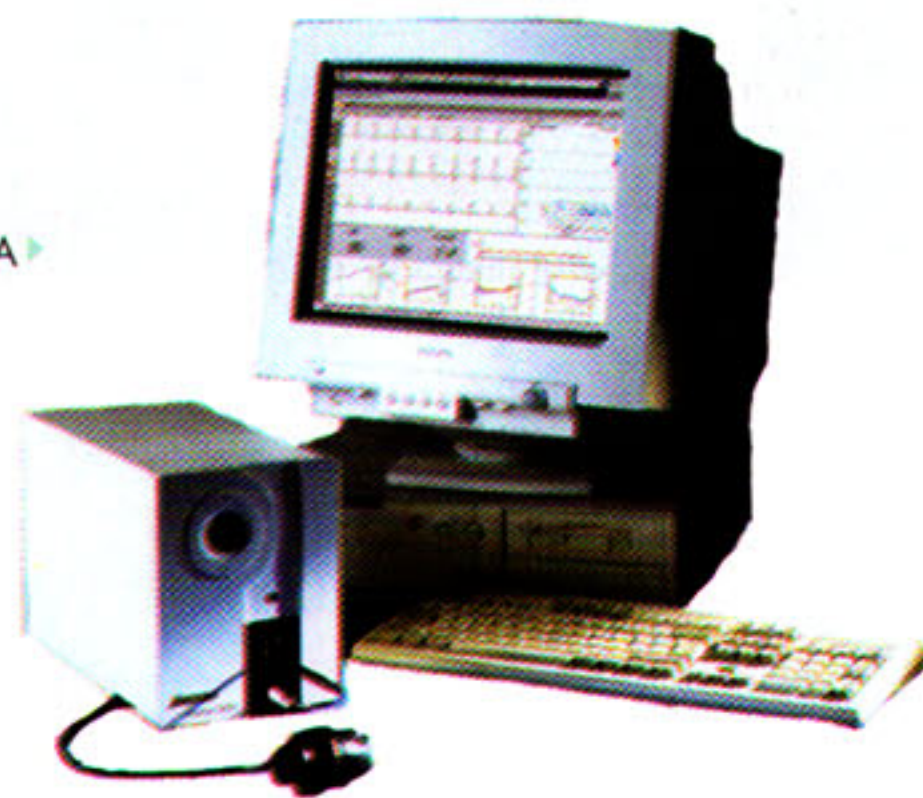
04 - FLOWSCREEN PRO

05 - MASTERSCOPE



ERGOESPIRÔMETROS PARA MEDICINA ESPORTIVA.

06 - OXICON DELTA



E. TAMUSSINO
& CIA. LTDA.

Representante Exclusivo no Brasil