Alexandre Chagas de Santana

**Efeito da talidomida na vasculopatia crônica do transplante
no modelo experimental de transplante de aorta**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Irene de Lourdes Noronha

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santana, Alexandre Chagas de

Efeito da talidomida na vasculopatia crônica do transplante no modelo experimental de transplante de aorta / Alexandre Chagas de Santana. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Nefrologia.

Orientadora: Irene de Lourdes Noronha.

Descritores: 1.Aorta/transplante 2.Talidomida 3.Citocinas 4.NF-kappa B 5.Neointima

USP/FM/DBD-432/13

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Vasculopatia crônica do transplante: mecanismos patogênicos	5
1.2. Modelo experimental de transplante de aorta para avaliar a lesão vascular do enxerto	10
1.3. Alternativa de tratamento: Talidomida.....	14
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Modelo experimental de transplante de aorta	19
3.1.1 Animais	19
3.1.2 Padronização de modelo de transplante de aorta.....	20
3.1.3 A cirurgia de transplante de aorta.	20
<u>3.1.3.a) A cirurgia no doador.....</u>	<u>21</u>
<u>3.1.3.b) A cirurgia no receptor.....</u>	<u>21</u>
3.1.4 Cuidados pós-operatórios.....	22
3.2. Tratamento farmacológico com talidomida	23
3.3. Desenho do estudo	23
3.3.1 Grupos experimentais.....	23
3.3.2 Eutanásia dos animais.....	24
3.4. Histologia	24
3.4.1 Coleta e processamento do tecido.....	24
3.4.2 Desparafinização.....	25
3.4.3 Coloração por verhoeff	25
3.4.4 Análise das lâminas	26
3.5. Imuno-histoquímica	26
3.5.1 Detecção de α -actina.....	26
3.5.2 Detecção da proliferação celular	27
3.5.3 Detecção de macrófagos e linfócitos T	28
3.6. Análise da apoptose	30

3.7. Quantificação dos resultados	32
3.8. PCR em tempo real	32
3.8.1 Síntese de cDNA e PCR em tempo real.....	32
3.9. Análise de citocinas por ensaios MULTIPLEX/LUMINEX	36
3.10. Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA) para detecção do NF- κ B.....	38
3.10.1 Extração de proteínas nucleares.....	38
3.10.2 Marcação da sonda	39
3.10.3 Reação de ligação e corrida do gel.....	40
3.11. Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Transplante de aorta.....	42
4.1.1 Modelo experimental de transplante de aorta.....	42
4.1.2 Histologia	44
4.1.3 Imuno-histoquímica.....	47
<u>4.1.3.a) α-actina</u>	48
<u>4.1.3.b) Proliferação celular</u>	49
<u>4.1.3.c) Macrófagos</u>	50
<u>4.1.3.d) Linfócitos T</u>	51
4.2. Análise da apoptose.....	52
4.3. Análise dos mediadores inflamatórios no enxerto de aorta	53
4.4. Concentração sérica dos mediadores inflamatórios.....	57
4.5. Análise da expressão do NF κ B	58
4.6. Análise das subunidades p50 e p65.....	59
5. DISCUSSÃO.....	61
6. RESUMO DOS RESULTADOS	76
7. CONCLUSÕES.....	77
8. REFERÊNCIAS	78

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
ABO	Sistema sanguíneo ABO
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>
ALO	Alogênico
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> (células apresentadoras de antígenos)
ATP	Trifosfato de adenosina
°C	Graus centígrados
µm	Micrômetro
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CD4	<i>Cluster of Differentiation 8</i> (células T auxiliares)
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i> (células T citotóxicas)
cél/mm ²	Células por milímetro quadrado
cm ²	Centímetro quadrado
CT	<i>Threshold Cycle</i>
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	<i>4'6-diamidino-2-phenylindole</i>
dL	Decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i> (fragmento cristalizado)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Grama
HCL	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (antígeno leucocitário humano)
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> (molécula de adesão intercelular 1)
IFN-γ	Interferon-gama
IH	Imuno-histoquímica
IκB	Inibidor kappa
IL-1	Interleucina 1

IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
ISO	Isogênico
KCL	Cloreto de Potássio
kg	Kilograma
L	Litro
m	Mili
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mm	Milímetro
NFκB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i> (fator nuclear kappa B)
NK	<i>Natural Killer</i>
p50	Subunidade p50
p65	Subunidade p65
PBS	Solução salina fosfato-tamponada
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> (células em atividade proliferativa)
pH	Potencial hidrogênico
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucleico)
RNA_m	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucleico mensageiro)
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
TBS	Solução salina tris-tamponada
TCR	<i>T-Cell Antigen Receptor</i> (receptor de células T)
TdT	<i>Terminal Desoxynucleotídeo Transferase</i>
TALID	Talidomida
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-alfa</i> (fator de crescimento tumoral-alfa)
TUNEL	<i>TdT-mediated X-dUTP nick end labeling</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> (moléculas de adesão das células vasculares-1)
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i> (células do músculo liso vascular)
vs	<i>Versus</i>
Δ	<i>Delta</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático de transplante de aorta.	22
Figura 2. Modelo experimental de transplante de aorta	43
Figura 3. Histologia para Verhoeff no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante	46
Figura 4. Imuno-histoquímica para expressão de α -actina no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.....	48
Figura 5. Análise comparativa da expressão de α -actina nas camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.....	48
Figura 6. Imuno-histoquímica para atividade proliferativa (PCNA ⁺) no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.....	49
Figura 7. Análise comparativa da expressão da proliferativa (PCNA ⁺) nas camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante	49
Figura 8. Imuno-histoquímica para macrófagos (ED-1 ⁺) no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.....	50
Figura 9. Análise comparativa de macrófagos (ED-1 ⁺) nas camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.....	50
Figura 10. Imuno-histoquímica para linfócitos T (CD-43 ⁺) no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.....	51
Figura 11. Análise comparativa de linfócitos T (CD-43 ⁺) nas camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.....	51
Figura 12. Imuno-histoquímica para apoptose (TUNEL) no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.....	52

Figura 13. Análise comparativa da apoptose (TUNEL) nas camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante	52
Figura 14. Análise dos mediadores inflamatórios no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante (TNF- α , IL-1 β , IL-6)	53
Figura 14. Análise dos mediadores inflamatórios no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10)	54
Figura 15. Quantificação densitométrica do NF κ B no enxerto de aorta.....	58
Figura 16. Ensaios de competição <i>supershift</i> no aloenxerto de aorta.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers (<i>forward e reverse</i>) utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	36
Tabela 2. Análise histológica das camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.	45
Tabela 3. Análise por imuno-histoquímica e TUNEL nas camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.....	47
Tabela 4. Análise da expressão gênica e da concentração tecidual dos mediadores inflamatórios no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.....	56
Tabela 5. Análise da concentração sérica dos mediadores inflamatórios 30 dias pós-transplante.....	57

RESUMO

Santana, A.C. **Efeito da talidomida na vasculopatia crônica do transplante no modelo experimental de transplante de aorta** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

A vasculopatia crônica do transplante constitui um dos principais obstáculos para o sucesso do transplante de órgãos a longo prazo. Caracteriza-se pela formação de uma camada neoíntima, que culmina no estreitamento da luz do vaso com consequente isquemia e falência do órgão transplantado. Embora diversos mecanismos imunológicos tenham sido descritos, a patogênese da vasculopatia crônica do transplante ainda não foi esclarecida e continua sem tratamento específico. Neste contexto, estratégias com alvos imunomodulatórios são de extrema importância. Dentre estas possíveis estratégias destaca-se a talidomida, uma droga que apresenta potentes propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias e que recentemente voltou a ter indicações clínicas. Assim, os objetivos do presente estudo foram: 1) Padronizar o modelo experimental de vasculopatia crônica do transplante no modelo experimental de transplante de aorta, pois este modelo mimetiza as principais características observadas na parede do vaso durante o processo de rejeição; 2) Analisar o efeito da talidomida sobre as alterações morfológicas vasculares (histologia para Verhoeff), componentes celulares (expressão de α -actina, atividade proliferativa, número de macrófagos e linfócitos T, através de imuno-histoquímica), além da participação da apoptose (técnica de TUNEL); 3) Avaliar o potencial efeito anti-inflamatório e imunomodulador da talidomida neste modelo, através da análise da expressão de mediadores da resposta imune (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, INF- γ , IL-4 e IL-10), bem como a atividade do NF κ B e o envolvimento das subunidades p50 e p65 no enxerto vascular. Foram utilizados ratos machos das linhagens isogênicas específicas, Fisher 344 e Lewis, distribuídos em 3 diferentes grupos (32 por grupo): **ISO** (transplante isogênico de aorta, Fisher para Fisher); **ALO** (transplante alogênico de aorta, Fisher para Lewis); **ALO+TALID** (transplante alogênico de aorta tratado com talidomida (200mg/Kg/dia/gavagem)). Os animais foram acompanhados por um período de 30 dias e, em seguida, sacrificados. Os resultados obtidos demonstraram que a padronização do modelo experimental de transplante de aorta foi viabilizada dentro de uma sequência metodológica extremamente precisa e reprodutível. Como esperado, os animais do grupo ISO não apresentaram sinais de rejeição no enxerto vascular, mantendo íntegra a arquitetura das camadas do vaso. Por outro lado, animais do grupo ALO desenvolveram vasculopatia crônica do transplante caracterizada pelo espessamento das camadas íntima e adventícia. Na camada média evidenciou-se diminuição das VSMC e acentuado rompimento das fibras elásticas. Além disso, os animais do grupo ALO apresentaram aumento da expressão de α -actina acompanhada de intensa atividade proliferativa celular, particularmente nas camadas neoíntima e adventícia, provavelmente pela migração das VSMC para a camada íntima. A análise por IH revelou intenso infiltrado de

macrófagos, linfócitos T, além de apoptose presente em todas as camadas do aloenxerto. A expressão gênica e a concentração tecidual dos mediadores da resposta imune TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, INF- γ e IL-10 também foram significativamente aumentadas no grupo ALO. Esses achados associaram-se com a ativação do NF κ B, bem como o envolvimento dos dímeros p50 e p65. O tratamento com talidomida promoveu um efeito vasculoprotetor através da redução da camada neoíntima e da inflamação local. Além disso, induziu diminuição da expressão gênica e da concentração tecidual dos mediadores TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, INF- γ , bem como aumento da IL-4 e IL-10. A talidomida também diminuiu a ativação do NF κ B. Conclusão: os resultados do presente estudo indicam que o modelo experimental de vasculopatia crônica do transplante constitui um modelo adequado para estudar as alterações nas camadas do vaso durante o processo de rejeição ao aloenxerto. A talidomida exerceu um efeito vasculoprotetor, atenuando a formação da neoíntima e do processo inflamatório local, bem como dos mediadores da resposta imune, provavelmente devido as suas propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias.

Descritores: 1.Aorta/Transplante; 2.Talidomida; 3.Citocinas; 4.NF-kappa B; 5.Neoíntima

SUMMARY

Santana, A.C. **Effects of thalidomide in chronic transplant vasculopathy in an experimental model of aortic transplantation** [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Chronic transplant vasculopathy is a major obstacle for the long-term success of organ transplantation. It is characterized by the formation of neointimal layer that culminate in the narrowing of the vessel lumen with consequent ischemia and failure of the transplanted organ. Although several immunological mechanisms have been described, the pathogenesis of chronic transplant vasculopathy remains unclear and continues without specific treatment. In this context, immunomodulatory strategies are extremely important. Among these possible strategies stands out thalidomide, a drug that display a potent anti-inflammatory and immunomodulatory properties and recently have returned to clinical indications. The aims of this study were: 1) To standardize the experimental model of chronic transplant vasculopathy, induced in an experimental model of aortic transplantation, because this model mimics the key features observed in the vessel wall during the rejection process; 2) To analyze the effects of thalidomide on vascular morphological (Verhoeff staining), cellular components (α -actin expression, proliferative activity, number of macrophages and T lymphocytes by immunohistochemistry), and the participation of apoptosis (TUNEL assay); 3) To evaluate the anti-inflammatory and immunomodulatory potential effects of thalidomide in this model by analyzing the mediator expression of the immune response (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, INF- γ , IL-4 e IL-10), as well as the NF κ B activity and involvement of p50 and p65 subunits in the vascular graft. We used male rats from the specific inbred strains, Fisher 344 and Lewis, divided into 3 different groups (32 per group). **ISO** (isogeneic aortic transplantation, Fisher to Fisher); **ALO** (allogeneic aortic transplantation, Fisher to Lewis); **ALO+THALID** (allogeneic aortic transplantation treated with thalidomide (200mg/Kg/day/gavage)). The animals were followed during a period of 30 days and then sacrificed. The results showed that the standardizing of the experimental model of aortic transplantation was possible within a sequence highly accurate and reproducible methodology. As expected, the animals of the ISO showed no sign of graft rejection keeping the entire layered architecture of the vessel. On the other hand, the ALO group developed chronic transplant vasculopathy characterized by thickness of the intima and adventitia. Furthermore, ALO group animals showed increase of α -actin expression accompanied by an intense cellular proliferative activity, particularly in the neointima and adventitia layers, probably due to VSMC migration to the intima. Analysis by IH revealed intense infiltration of macrophages and T lymphocytes, as well as apoptosis in all layers of the allograft. The gene expression and tissue concentrations of the mediators of immune response TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, INF- γ , and IL-10 were also significantly higher in the ALO group. These findings were associated with the NF κ B activation, as well as the involvement of p50 and p65 dimers. Treatment

with thalidomide promoted a vascular protective effect by reducing the neointimal formation and local inflammation. Moreover, induced a decrease in the gene expression and tissue concentration of the inflammatory mediators TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, INF- γ , as well as increase of IL-4 and IL-10. Thalidomide also decreased the NF κ B activation. Conclusion: the results of this study indicate that experimental model of chronic transplant vasculopathy is an appropriate model to study changes in the vessel layers during the process of allograft rejection. Thalidomide promoted a vascular protective effect, attenuating neointimal formation and local inflammation, as well as mediators of immune response, probably due to its anti-inflammatory and immunomodulatory properties.

Descriptors: 1.Aortic/Transplantation; 2.Thalidomide; 3.Cytokines; 4.NF-kappa B; 5.Neointima

1. INTRODUÇÃO

O transplante de órgãos é atualmente reconhecido como uma importante alternativa terapêutica em casos de falência funcional total e irreversível de determinados órgãos, tendo como objetivo prolongar e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Entretanto, apesar dos avanços alcançados na prática de transplante de órgãos, a rejeição ao aloenxerto ainda constitui uma importante complicação pós-transplante.

A rejeição ao aloenxerto envolve uma complexa rede de interações celulares e humorais, na qual o linfócito T apresenta um papel central e essencial. Pode ser definida como um processo de destruição do órgão transplantado, iniciado e direcionado contra aloantígenos, através de uma complexa interação entre células reguladoras, células efectoras e mediadores inflamatórios (citocinas e fatores de crescimento) [Ali et al., 2013; Zheng et al., 2011; Hillebrands et al., 2003]. A rejeição ao aloenxerto pode ser classificada basicamente em três tipos: rejeição mediada por linfócitos T, rejeição humoral e rejeição crônica. Muito embora esses critérios tenham sido criados com base nos achados histológicos renais [Cornell et al., 2008], alterações semelhantes são encontradas em outros e, outros tipos de órgãos.

A rejeição humoral está relacionada à presença de anticorpos pré-existentes no soro do receptor, que usualmente podem ser detectados pelo “*crossmatch*” antes do transplante. Estes anticorpos são, geralmente, dirigidos contra

antígenos sanguíneos ABO ou contra antígenos de histocompatibilidade do doador.

A rejeição aguda mediada por linfócitos T é a forma mais comum de rejeição. Manifesta-se em poucos dias ou semanas após o transplante e resulta da ativação primária de linfócitos T e do consequente desencadeamento de vários mecanismos efetores. Os linfócitos T reconhecem moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC: *Major Histocompatibility Complex*, nos humanos chamados de HLA: *Human Leukocyte Antigen*) incompatíveis com seu próprio repertório. Embora as moléculas MHC sejam as mais importantes para desencadear o processo de rejeição, transplantes entre irmãos HLA-idênticos também apresentam rejeição ao enxerto, apontando para o papel de moléculas não-MHC (denominadas antígenos menores ou secundários de histocompatibilidade) neste processo.

Neste contexto, a resposta imune inicia-se quando os linfócitos T do receptor interagem com os antígenos do doador. O reconhecimento de aloantígenos é feito pelo TCR (*T-Cell Antigen Receptor* – Receptor de Linfócitos T). Os TCR não são capazes de reconhecer antígenos livres, reconhecendo-os apenas na superfície de outras células, sejam células do doador, sejam células apresentadoras de antígeno (APC - *Antigen Presenting Cells*) [Wood et al., 2012]. O transplante é a única situação imunológica na qual esta interação e consequente ativação do linfócito T pode ocorrer por 3 vias distintas: a via direta de aloreconhecimento (na qual os linfócitos T do receptor reconhecem alopeptídeos intactos do MHC apresentado pelas APC dos doadores), a via

indireta de aloreconhecimento (na qual linfócitos T do receptor reconhecem aloantígenos MHC derivados do doador que foram processados e apresentados (como peptídeo+MHC) na superfície celular pelas APC do receptor) e a via semi-direta de aloreconhecimento (através da captura do complexo peptídeo+MHC do doador pelas APC do receptor), cuja importância ainda não está clara e continua sendo investigada [Wood et al., 2012].

A rejeição aguda na fase inicial pós-transplante é mediada predominantemente pela via direta de aloreconhecimento, pois os órgãos recentemente transplantados contém um alto número de leucócitos passageiros (que foram transferidos junto com o órgão transplantado), sendo a maioria células dendríticas, capazes de apresentar antígenos por esta via. No entanto, como os leucócitos passageiros do doador vão sendo depletados, o papel da via direta na rejeição ao aloenxerto diminui com o tempo. Por outro lado, as APC do receptor continuam infiltrando o enxerto, processando e apresentando alopeptídeos solúveis do doador. Por este motivo, a longo prazo, ocorre predominância da resposta alôgena mediada por linfócitos T ativados pela via indireta [Joudeh et al., 2013; Wood et al., 2012; Cornell et al., 2008].

A rejeição crônica é a causa mais frequente de perda de função do enxerto no período tardio pós-transplante, sendo diagnosticada pela presença de uma deterioração progressiva da função do enxerto associada a alterações morfológicas vasculares e intersticiais [Joudeh et al., 2013]. Embora as características histológicas associadas ao processo de rejeição crônica

variem de acordo com o tipo de órgão transplantado, podem ser agrupadas em 4 principais alterações: 1) inflamação, caracterizada por infiltrado inflamatório composto principalmente por linfócitos e macrófagos; 2) fibrose, que aumenta progressivamente à medida que a rejeição crônica piora; 3) destruição de células somáticas do órgão; 4) lesão vascular (vasculopatia crônica do transplante) particularmente proeminente no transplante cardíaco, porém ocorre em todos os tipos de transplante de órgãos [Joudeh et al., 2013; Ali et al., 2013; Mitchell et al., 2009; Cornell et al., 2008; Mitchell et al., 2007].

Atualmente, o termo “vasculopatia crônica do transplante” tem sido utilizado para definir as alterações que acometem os vasos do aloenxerto durante o processo de rejeição crônica. Tal fenômeno é caracterizado pelo espessamento progressivo e difuso da camada íntima (camada neoíntima), processo pelo qual é decorrente da migração e proliferação das células da musculatura lisa vascular (*vascular smooth muscle cells* - VSMC) na íntima, culminando no estreitamento significativo da luz das artérias com consequente isquemia e falência do órgão transplantado [Mitchell et al., 2009].

Diversas evidências sugerem que esse processo inicia-se a partir da lesão e ativação das células endoteliais [Zheng et al., 2011]. As células endoteliais ativadas aumentam a expressão de moléculas MHC e de moléculas de adesão, além de produzirem diversos mediadores inflamatórios, promovendo um fenômeno de inflamação local com recrutamento de linfócitos e monócitos. Tal condição culmina no remodelamento vascular, que é caracterizado pelo

estreitamento significativo da luz das artérias com consequente isquemia e falência do órgão transplantado [Zheng et al., 2011, Mitchell et al., 2009; Hillebrands et al, 2007].

Apesar de ser uma complicação grave e frequente, a vasculopatia crônica do transplante continua sendo pouco compreendida e sem alternativas terapêuticas específicas. Por estes motivos, o estudo dos mecanismos envolvidos na vasculopatia crônica do transplante, bem como a procura estratégias terapêuticas que possam reduzir ou impedir a vasculopatia do transplante assumem grande importância.

1.1. Vasculopatia crônica do transplante: mecanismos patogênicos

No transplante de órgãos, o endotélio representa a primeira interface do enxerto com as células do sistema imune do receptor. Dessa forma, a célula endotelial é o primeiro alvo de alorreconhecimento pelos linfócitos T, fundamental no desencadeamento da rejeição ao aloenxerto.

As células endoteliais possuem a capacidade para atuar como APC, amplificando a ativação de linfócitos T, além de participar de mecanismos de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC - *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) através da ligação de aloanticorpos nos receptores Fc expressos na sua superfície celular, que

contribuem para a lesão tecidual [Butler et al., 2012; Wood et al., 2012; Taflin et al., 2011; Turesson, 2004].

Outra via de participação da célula endotelial na vasculopatia crônica do transplante é por meio de secreção de variadas substâncias, incluindo moléculas de adesão e mediadores inflamatórios. Entre as moléculas e adesão, destacam-se a E-selectina, P-selectina, ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular). Tais moléculas constituem um grupo de moléculas especializadas na regulação das interações celulares. São estas moléculas que ao se ligarem as integrinas dos leucócitos circulantes, permitem transmigração dessas células para o espaço subendotelial (íntima), fundamental para a formação da camada neoíntima.

As citocinas produzidas pelas células endoteliais são potentes moduladores de uma variedade de funções sobre a parede do vaso, não apenas no contexto da resposta imunológica, mas também na regulação de fenômenos diversos, tais como alterações na expressão de moléculas de adesão, alterações na coagulação e alterações na permeabilidade capilar [Naemi et al., 2013].

Neste contexto, acredita-se que a regulação da expressão de diferentes moléculas e adesão, tem sido atribuída a liberação local de citocinas sintetizadas pelas células endoteliais. Destas, salientam-se o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ e IL-4. Na vigência da disfunção endotelial, a concentração destas

se eleva, estimulando a produção de moléculas de adesão, assim favorecendo o recrutamento e a adesão de monócitos a superfície da célula endotelial [Zheng et al., 2011; Belperio et al., 2008].

A regulação da produção desses mediadores inflamatórios ocorre, principalmente, na transcrição gênica, embora controle pós-transcricional também possa ocorrer. O fato de tanto o RNA mensageiro (RNAm) como peptídeo apresentarem meia vida curta, confere ao sistema a característica de controle fino, rápido e extremamente eficiente da regulação desses fatores. As células endoteliais também expressam receptores para citocinas e fatores de crescimento, tornando-se assim alvo para a ação desses peptídeos de maneira autócrina e/ou parácrina, que amplificam a inflamação local com recrutamento de linfócitos e monócitos que se acumulam no espaço subendotelial [Mitchell et al., 2009].

Além disso, as citocinas produzidas pelas células endoteliais podem induzir a migração de VSMC da túnica média para a túnica íntima [Hillebrands et al., 2007]. De fato, observações prévias de outros autores demonstraram que citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e INF- γ podem estimular a migração e/ou proliferação das VSMC [Davis et al., 2012; Wang et al., 2011; Yu et al., 2011].

Uma vez na íntima, as VSMC continuam a proliferar, produzindo citocinas e fatores de crescimento que, por sua vez, estimulam a produção de fibras colágenas e deposição de matriz extracelular, resultando em espessamento

concêntrico da íntima com subsequente obliteração parcial ou total do lúmen do vaso [Roux et al., 2011, Hillebrands et al., 2007]. Estudos recentes sugerem que fibroblastos ativados na camada adventícia também podem produzir citocinas e fatores de crescimento e contribuir para a formação da camada neoíntima [Ji et al., 2010].

Em um estudo clássico, Hruban e cols usando técnica de hibridização *in situ* (marcação fluorescência específica para cromossomo Y), observaram que entre pacientes submetidos a transplante de coração (*sex-mismatched*), aproximadamente 95% das VSMC presentes na camada neoíntima eram de origem do receptor [Hubran et al., 1993]. Em paralelo, estudos mais recentes têm evidenciado que células pluripotentes procedentes do sangue periférico, tais como células progenitoras hematopoiéticas ou células progenitoras endoteliais, também contribuem para a formação da camada neoíntima [Li et al., 2013; Roberts et al., 2005; Sata et al., 2002].

Outros fatores que participam do comportamento das células responsáveis pela patogênese da vasculopatia crônica do transplante vem sendo mais bem compreendida pelo estudo de sistemas de sinalização intracelular. Neste sentido, destaca-se o papel do NF κ B (fator nuclear *kappa* B).

O NF κ B é um fator de transcrição constituído de duas subunidades proteicas: p50 e p65. O NF κ B integra uma família de fatores de transcrição redox-sensíveis presentes nas células endoteliais, VSMC, macrófagos e linfócitos [Gareus et al., 2008; de Martin et al., 2000]. Tal fator reside em forma inativa

no citoplasma, ligado a proteínas inibitórias chamadas I κ B (inibidor de *kappa* B). As I κ B impedem a translocação do NF κ B para o núcleo da célula.

As I κ B por sua vez, são fosforiladas por diversos estímulos, incluindo espécies reativas de oxigênio, citocinas e anóxia. A fosforilação das I κ B transcorre principalmente através do complexo I κ B quinase. Em seguida, ocorre separação das subunidades p50 e p65 permitindo a translocação nuclear do NF κ B, o qual interage a regiões promotoras dos genes que regula, levando a um aumento na expressão do gene alvo [Vallabhapurapu et al., 2009].

Vários fatores, além do estresse oxidativo [Munhoz et al., 2006], ativam o NF- κ B como, por exemplo o excesso de cálcio [Tabary et al., 2006], força de cisalhamento vascular [Castier et al., 2009] e citocinas inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β [de Sá Lima et al., 2013]. A ativação do NF- κ B induz genes de atividade pro-apoptótica como enzimas relacionadas com estresse oxidativo e moléculas de adesão celular [Oeckinghaus et al., 2011; Wu et al., 2010; Vallabhapurapu et al., 2009; Munhoz et al., 2006]. Devido ao fato do NF- κ B estimular vários tipos de genes, é esperado que o NF- κ B exerça funções distintas em resposta a diferentes estímulos em variados tipos celulares.

O NF- κ B também parece ser fundamental para a proliferação das VSMC desencadeada pela trombina e pelo TNF- α . O NF- κ B é expresso pelas VSMC após lesão por cateter balão e é responsável pela expressão de ICAM-1 e

VCAM-1. Níveis elevados de NF- κ B podem ser encontrados nas lesões de aterosclerose [Mallavia et al., 2013].

Neste contexto, o NF- κ B pode contribuir para a progressão da vasculopatia crônica do transplante, pois a maioria dos genes pro-inflamatórios expressos nas células endoteliais durante a fase inicial da lesão vascular e, em resposta aos mediadores inflamatórios, são dependentes deste fator nuclear.

Embora uma multiplicidade de mecanismos celulares e moleculares tenham sido descritos, a patogênese da vasculopatia crônica do transplante ainda permanece controversa e sem tratamento.

Neste contexto, estratégias com alvos imunomodulatórios em modelos animais de transplante são de extrema importância, não apenas para o esclarecimento dos mecanismos patogênicos mas principalmente por fornecerem informações básicas que possibilitarão o desenvolvimento de novas estratégias para manuseio e controle da resposta indesejável do sistema imune.

1.2. Modelo experimental de transplante de aorta para avaliar a lesão vascular do aloenxerto

Um dos modelos experimentais de rejeição crônica em ratos é obtido ao se transplantar órgãos de linhagens Fisher 344 (doador) em ratos Lewis (receptor).

Ratos Fisher 344 e Lewis são obtidos a partir de cruzamentos entre irmãos (endocruzamentos) da mesma geração por, pelo menos, 20 gerações consecutivas em pares monogâmicos permanentes. O resultado garante características de uniformidade genética.

Modelos experimentais de rejeição são desenvolvidos através da transplantação de órgãos entre animais de diferentes linhagens ou entre animais de linhagem alogênica, ou seja, animais criados pelo método *outbred*. Animais *outbred* são animais originados a partir de cruzamentos entre proles de diferentes casais (matrizes). Por outro lado, os animais desenvolvidos através do método *inbred*, são animais originados através do cruzamento sistemático e ininterrupto entre irmãos provenientes da mesma matriz, ou seja, entre animais da mesma prole. Animais criados no método *inbred* são isogênicos e, portanto, não rejeitam o enxerto.

O primeiro modelo experimental de transplante utilizando ratos das linhagens Fisher e Lewis foi desenvolvido em 1969 por White e cols [White et al., 1969]. Desde então, vários modelos experimentais de transplante foram gerados a partir dessas linhagens isogênicas de ratos [Hamar et al., 2005; Religa et al., 2005; Orth et al., 1999], tornando-se ferramentas fundamentais para a elucidação da patogênese do processo de rejeição.

O transplante experimental utilizando-se como doador, órgãos ou tecidos de ratos Fisher 344 em receptores Lewis, reproduz as características da rejeição crônica, incluindo alterações funcionais e histológicas [Marco, 2006; Religa et al; 2005; el Khatib et al., 1990]. A resposta aloimune, ocorre pela disparidade

MHC entre doador e receptor. Em ratos Fisher e Lewis os *loci* MHC classe I são, principalmente, MHC A, E, G e C, enquanto os de classe II são MHC B e D. Esses animais são considerados MHC haploidênticos. Além disso, diferem também nos *loci* do complexo menor de histocompatibilidade (não MHC), com haplótipos variantes na região RT1: F344.RT1^{1v1} nos ratos Fisher e LEW.RT1¹ nos ratos Lewis [Bedi et al., 2010].

A rejeição aguda é um tipo de rejeição atualmente bem estabelecida na clínica de transplante, podendo ser mediada por anticorpos e por células. A mediada por anticorpos pode começar dentro de alguns dias após o transplante, mas também pode contribuir para a perda do tardia do enxerto. O mecanismo da lesão mediada por anticorpos é, principalmente, baseado na ativação do sistema complemento, culminando em trombose, isquemia e necrose do tecido.

A rejeição aguda mediada por células caracteriza-se por uma variedade de leucócitos incluindo macrófagos, células T citotóxicas (CD8⁺) e auxiliares (CD4⁺) e plasmócitos. Estas células se envolvem em uma cascata de eventos que culmina na expansão clonal de células efetoras e anticorpos com atividade citotóxica, que terminam por destruir o aloenxerto se a reação não é modificada por agentes imunossupressores eficazes.

As principais moléculas por desencadear a rejeição de órgãos, são as moléculas MHC. Estão divididas em três classes: classe I, classe II e classe III. As moléculas de classe I e de classe II são expressas na superfície celular, apresentando grande polimorfismo genético, enquanto as moléculas de

classe III são, em sua maioria, fatores humorais. Variações na sequência de aminoácidos em regiões definidas são responsáveis pelo grande polimorfismo genético descrito para os antígenos de classe I e de classe II.

Além do grande polimorfismo gerado pela combinação dos diferentes alelos de classe I e II, sabe-se que para ocorrer a ativação do sistema imune no processo de rejeição, se faz necessário a interação dos linfócitos T através de seu receptor (RCT) com as moléculas MHC e um fragmento de proteínas estranha (peptídeo). Esse reconhecimento é feito pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que exercem funções auxiliaadoras, citotóxicas e/ou supressoras, respectivamente. Dessa forma, os linfócitos T CD8⁺ reconhecem um peptídeo endógeno apresentado por uma molécula de classe I, que uma vez ativados desencadeiam uma rejeição citotóxica, lisando a célula alvo. Já os linfócitos T CD4⁺ reconhecem em conjunto com as moléculas de classe II um peptídeo exógeno, que sofre o processo de endocitose pela célula apresentadora de antígenos. A ativação da célula T auxiliadora tem múltiplos efeitos, propiciando que linfócitos B se diferenciem e multipliquem gerando a produção de anticorpos, bem como permitindo aos linfócitos T que determinem a diferenciação para funções efetoras. Assim, o papel do MHC em apresentar peptídeos para os receptores de células T, pode explicar o controle genético da resposta imune exercido pelo MHC neste modelo.

Mennander e cols descreveram em 1991 o primeiro modelo experimental de rejeição crônica experimental em transplante de aorta, utilizando ratos das linhagens Dark Agouti e Wistar Furth [Mennander et al., 1991]. Basicamente, este modelo experimental foi desenvolvido obtendo um fragmento de aorta

torácica do doador e transplantando no receptor na região infra-renal. O estabelecimento da lesão vascular compatível com a vasculopatia crônica do transplante pode ser observado 30 a 60 dias pós-transplante. A formação da camada neoíntima associada a presença de monócitos e linfócitos T com recrutamento contínuo de novas células através da liberação de citocinas e fatores de crescimento no aloenxerto vascular, também são características desse modelo [Zheng et al., 2011].

Com base nessas observações, o modelo experimental de transplante de aorta constitui um excelente modelo para o estudo da vasculopatia do transplante. Esse modelo mimetiza as características imunológicas, observadas em humanos, na parede do vaso durante o processo de rejeição de órgãos. Neste contexto, o modelo experimental de transplante de aorta, tornou-se ferramenta fundamental para o estudo da patogênese *in vivo*, bem como para testar e desenvolver novas estratégias terapêuticas.

1.3. Alternativa de tratamento: talidomida

A talidomida é um agente derivado sintético do ácido glutâmico. Seu nome químico é [(±)2-(2,6-dioxo-3-piperidinil)-1H-isoindol-1,3-(2H)-diona]. Este composto possui duas formas opticamente ativa: dextrogiro (+) (R) e levogira (-) (S). Estudos tem demonstrado que o enantiômero dextrogiro é responsável pelas propriedades sedativas, enquanto que o enantiômero levogiro é

responsável por propriedades imunomoduladora específicas que a droga possui [Jin et al., 2013].

A talidomida foi sintetizada na Alemanha em 1954 e foi prescrita como sedativo/hipnótico. Por seu rápido início de ação, a droga ganhou popularidade como uma alternativa segura aos barbitúricos. No final dos anos 1950, foram descritos na Alemanha, Reino Unido e Austrália os primeiros casos de malformações congênitas, onde crianças passaram a nascer com focomelia, mas não foi imediatamente óbvio o motivo para tal doença. Os bebês nascidos desta tragédia são chamados de "bebês da talidomida", ou "geração talidomida". Em 1962, após inúmeros relatos de malformações congênitas associadas ao seu uso como anti-emético durante a gestação, a droga foi retirada do comércio [Tansey et al., 2001; Clark et al., 2001; Raje et al., 1999].

Mais recentemente, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso clínico da talidomida para o tratamento de mieloma múltiplo, eritema nodoso da hanseníase, HIV⁺, tuberculose, alguns tipos de câncer, doença inflamatória intestinal, entre outras patologias [Jin et al., 2013; Huang et al., 2002; Wohl et al., 2002; Tansey et al., 2001; Raje et al., 1999; Singhal et al., 1999; Tramontana et al., 1995].

Além das evidências clínicas da talidomida, dados experimentais evidenciam propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias específicas, particularmente bloqueando citocinas Th1 [Santana et al., 2013]. Aparentemente, a maior parte dos efeitos desta droga se deve à supressão

do fator de transcrição nuclear NF- κ B [Majumdar et al., 2002]. Assim, a talidomida diminui a produção de citocinas, tais como TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-12, enquanto que estimula a produção de IL-10 [Majumdar et al., 2012; Keifer et al., 2001; Yagyu et al., 2005; Sampaio et al., 1991].

Em um estudo mais recente, Ito e cols constataram que o alvo primário do efeito teratogênico da talidomida é a proteína cereblon. A talidomida age ligando-se no cereblon provocando comprometimento no desenvolvimento de nadadeiras em peixes e de membros inferiores em aves [Ito et al., 2010].

A talidomida também possui ações anti-proliferativas e anti-fibróticas. Park e cols descreveram, em um estudo clássico, a potente ação inibitória da talidomida sobre a hiperplasia de íntima em carótida de ratos após lesão mecânica induzida por cateter balão [Park et al., 2004]. Por seus efeitos sobre os mecanismos de inflamação, angiogênese e fibrose, a talidomida, em tese, poderia ser empregada na prevenção e/ou tratamento do estado inflamatório crônico. Neste contexto, Arai e cols demonstraram resultados positivos da talidomida na prevenção do desenvolvimento de fibrose peritoneal em modelo experimental [Arai et al., 2011].

Considerando que a vasculopatia crônica do transplante constitui uma importante barreira para o sucesso dos transplantes de órgãos a longo prazo, e os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores consistentemente reconhecidos da talidomida, os objetivos do presente estudo foram: Padronizar o modelo experimental de transplante de aorta, uma vez que este modelo mimetiza as características fundamentais observadas na parede do

vaso durante o processo de rejeição; Analisar e comparar o efeito da talidomida sobre os componentes celulares e a expressão de mediadores da resposta imune no enxerto vascular.

2. OBJETIVOS

O objetivo central do presente estudo foi analisar e caracterizar o efeito da talidomida na vasculopatia crônica do transplante no modelo experimental de transplante de aorta.

Mais especificamente, os objetivos foram:

- 1) Padronizar o modelo experimental de transplante de aorta isogênico e alogênico;
- 2) No modelo experimental de transplante de aorta, analisar as alterações morfológicas do vaso (coloração de verhoeff) através da quantificação das camadas neoíntima, média e adventícia;
- 3) Analisar a participação de mecanismos celulares na lesão vascular do enxerto, através da expressão de α -actina, atividade proliferativa, bem como quantificação da infiltração de macrófagos e linfócitos T nas camadas do vaso, por imuno-histoquímica;
- 4) Investigar a participação local de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, INF- γ , IL-4 e IL-10) através da análise da expressão gênica (PCR em tempo real) e da concentração protéica (MULTIPLEX/LUMINEX) no enxerto vascular;
- 5) Analisar a atividade do fator de transcrição NF κ B, bem como a participação das subunidades p50 e p65 (RelA) no enxerto vascular;
- 6) Analisar a possível repercussão inflamatória sistêmica através da quantificação de mediadores inflamatórios no soro (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, INF- γ , IL-4 e IL-10) (MULTIPLEX/ LUMINEX).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Toda metodologia aplicada no presente estudo foi desenvolvida em concordância com o guia institucional de cuidados e uso de laboratório, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP – 141/11) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1. Modelo experimental de transplante de aorta

3.1.1. Animais

Os animais utilizados no presente estudo consistem em linhagens isogênicas específicas de ratos Fisher (F344) e ratos Lewis (LEW). Estes animais são obtidos a partir de cruzamentos entre irmãos (endocruzamentos) da mesma geração por, pelo menos, 20 gerações consecutivas em pares monogâmicos permanentes oferecendo, assim, uniformidade genética entre as linhagens.

Todos os animais foram criados no biotério local do laboratório de investigação médica 16 (LIM 16) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a partir de matrizes adquiridas comercialmente do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas (UNICAMP).

Todo estudo foi conduzido utilizando ratos Fisher e ratos Lewis machos para evitar heterogeneidade experimental relacionada ao gênero. Foram realizados 2 tipos de transplantes: Transplante de aorta de ratos Fisher para ratos Fisher

(transplante isogênico) e de ratos Fisher para ratos Lewis (transplante alogênico).

3.1.2. Padronização do modelo de transplante de aorta

A padronização do modelo experimental de transplante de aorta foi realizada em duas etapas: A primeira etapa baseou-se no treinamento de suturas cirúrgicas utilizando luvas de borracha. Vários cortes foram feitos na luva simulando bordas de estruturas que foram unidos com sutura contínua ou simples, mimetizando situações encontradas no ato cirúrgico. Em paralelo, foi realizado treinamento específico para reconhecer e manipular materiais de microcirurgia de acordo com a sequência dos tempos operatórios.

A segunda etapa consistiu na sedimentação dos conhecimentos e habilidades adquiridos na etapa anterior através do treinamento de ligaduras, dissecação e ressecção de nervos e artérias, bem como arteriorrafias e anastomoses arteriais em animais destinados ao sacrifício.

3.1.3. A cirurgia de transplante de aorta

Os animais foram inicialmente pesados e então submetidos ao protocolo de transplante de aorta descrito por Mennander e cols [Mennander et al., 1991] (**Figura 1**). Após a indução anestésica através de injeção intraperitoneal de cetamina (35,6mg/Kg) (Ketamin-S, Crisália) e xilazina (5,7mg/Kg) (Ronpun, Bayer, Alemanha), foi realizada tricotomia na região abdominal e assepsia com álcool iodado a 2%.

3.1.3.a) A cirurgia no doador: Foi realizada uma laparotomia longitudinal mediana de aproximadamente 5,0 cm. Com a cavidade abdominal aberta, as vísceras foram afastadas permitindo exposição da aorta e da veia cava, que foram cuidadosamente dissecadas e isoladas. Em seguida, um segmento de aorta de aproximadamente 1,5 cm foi retirado, perfundido e imediatamente acondicionado em recipiente plástico contendo soro fisiológico estéril gelado (4°C) para, posteriormente, ser implantado no receptor. Durante todo procedimento cirúrgico, vísceras e cavidade abdominal foram constantemente umedecidas com soro fisiológico estéril.

3.1.3.b) A cirurgia no receptor: O receptor foi preparado da mesma forma que o doador, sendo que após a dissecação e isolamento da aorta e da veia cava, *clamps* vasculares foram colocados na aorta entre a emergência das artérias renais bilaterais e a bifurcação das artérias ilíacas comuns. Em seguida, foi realizada secção da aorta para implante do enxerto. A conexão do enxerto foi realizada utilizando anastomoses do tipo término-terminal com pontos simples e fio cirúrgico polipropileno 7-0 (PolySuture®, São Sebastião do Paraíso, Brasil).

Após o término das anastomoses, os *clamps* foram liberados restabelecendo o fluxo sanguíneo. Por fim, foi realizado fechamento da parede abdominal em dois planos: o primeiro com sutura da camada muscular com fio catgut simples 4-0 (Shalon®, São Luis de Montes Belos, Brasil) e o segundo com sutura da pele com fio nylon 4-0 (Microsuture®, São Paulo, Brasil). Ambas foram realizadas com pontos separados equidistantes entre si.

Figura 1. Modelo experimental de transplante de aorta. **(A)** A aorta de receptor é dividida entre 2 clampes. **(B)** A aorta do doador é conectada na posição ortotópica; as anastomoses são realizadas com pontos simples. **(C)** Os clampes são retirados e o fluxo sanguíneo é restabelecido. Adaptado de Camille Dambrin - *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 1999.

3.1.4. Cuidados pós-operatórios

Ainda sob anestesia todos os animais receberam Tramal (Cloridrato de Tramadol, Medley, Campinas, Brasil) por via intramuscular, diluído em solução fisiológica estéril na dose de 30mg/Kg. O período de pós-operatório foi de responsabilidade do pesquisador, sendo por ele julgada a necessidade de aquecimento das gaiolas, de revisão cirúrgica ou eutanásia.

Na reavaliação pós-operatória imediata (primeiras 24h após a cirurgia) a dose de Tramal foi repetida em todos os animais, exceto aqueles que não necessitaram analgesia. Nas reavaliações subsequentes, a dose de Tramal foi repetida mais duas vezes (após 48 e 72 horas da cirurgia) caso o animal ainda apresentasse sinais de dor.

3.2. Tratamento farmacológico com talidomida

Os animais receberam tratamento farmacológico com talidomida (TALID) (Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brasil) na dose de 200mg/Kg/dia dissolvido em solução fisiológica estéril contendo 10% de DMSO e administrado por gavagem [Chong et al., 2006; Oliver et al., 1999].

3.3. Desenho do estudo

3.3.1. Grupos experimentais

Para o estudo foram utilizados 2 diferentes tipos de transplante de aorta: de ratos F344 para ratos F344 (transplante isogênico) e de ratos F344 para ratos Lewis (transplante alogênico). Para os transplantes isogênicos foram utilizados 66 ratos F344 e para os transplantes alogênicos foram utilizados 64 ratos Lewis e 64 ratos F344. Os animais foram acompanhados por um período de 30 dias. O estudo foi desenvolvido com 3 grupos constituídos:

ISO: Animais submetidos ao isotransplante de aorta que receberam solução veículo por gavagem (n=32);

ALO: Animais submetidos ao alotransplante de aorta que receberam solução veículo por gavagem (n=32);

ALO + TALID: Animais submetidos ao alotransplante de aorta que receberam tratamento farmacológico com talidomida (n=32).

3.3.2. Eutanásia dos animais

Após o período do protocolo experimental, os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal com coquetel de cetamina/xilazina utilizado para indução anestésica, administrado na dose de 70mg/kg/12mg/kg. Com os animais anestesiados foi realizada punção do ventrículo esquerdo com “butterfly” 19G (KDL®, Guarulhos, Brasil). A coleta de sangue foi realizada, através da punção da veia cava, com auxílio de uma seringa de 5 mL acoplada a uma agulha de 21G. Imediatamente após a coleta sanguínea, foi iniciada a perfusão através do “butterfly” inserido no ventrículo esquerdo com soro fisiológico estéril, a uma pressão de 110 mmHg durante 2 minutos.

3.4. Histologia

3.4.1. Coleta e processamento do tecido

O fragmento de aorta de aproximadamente 2 cm foi cuidadosamente dissecado e lavado com solução fisiológica gelada e fixadas em formaldeído 4%. Em seguida, o fragmento foi colocado em caixeta perfurada e mantido em etanol 70% em tampão fosfato até a inclusão em blocos de parafina.

O processo de parafinização foi realizado pelo processador automático de tecido “histoquine” (Jung-Histokinette 2000 Leica, Nussloch, Alemanha) e durou aproximadamente 14 horas. O processo foi iniciado pela desidratação dos tecidos em álcoois com concentrações progressivas (álcool 50%, álcool 70%, álcool 96% (2 banhos)), e álcool absoluto (2 banhos), seguida da diafanização, passando os tecidos em uma solução de álcool absoluto + xilol

e xilol (3 banhos), sendo então imersos em parafina fundida a 60°C. O material parafinado foi incluído em blocos e permaneceu em temperatura ambiente.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) com navalhas descartáveis. As secções, com espessura entre 3 e 4 µm, foram aderidas em lâminas previamente revestidas por silano 2% (Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA). As lâminas com os cortes permaneceram em estufa (Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil) a 60°C por 2 horas e em seguida foram armazenadas em temperatura ambiente.

3.4.2. Desparafinização

As lâminas passaram por um processo de desparafinização, ou seja, permaneceram por 9 minutos em xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 2 vezes. Em seguida, as lâminas foram desidratadas, através de banho em etanol absoluto (2 vezes) (Merck, Darmstadt, Alemanha), etanol 96% e etanol 70%. Para finalizar este processo, as lâminas foram imersas em água destilada e processadas.

3.4.3. Coloração por verhoeff

Após desparafinização, as lâminas foram imersas em uma solução de Verhoeff a 4°C durante 20 minutos. Em seguida, os fragmentos foram submersos em diferenciador (cloreto férrico a 2%) durante 1 minuto até ocorrer descoloração parcial do tecido muscular. As lâminas foram retiradas e lavadas em água corrente por 1 minuto. Após isso, os fragmentos passaram

por uma série de lavagens rápidas com etanol 96%, a 70% e água destilada. Ao final, as lâminas foram imersas em solução de Van Gieson (composta de ácido fucsínico e ácido pícrico) por 5 minutos para coloração do colágeno sendo, por último, lavadas com álcool 96% e imersas em xilol antes de serem cobertas. As lamínulas foram fixadas utilizando meio permanente Permount (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.4.4. Análise das lâminas

Todas as lâminas foram analisadas de maneira que o pesquisador não tivesse ciência de qual grupo seria analisado. A análise morfológica da aorta foi realizada a partir de cortes histológicos ultrafinos da aorta (2 μ m) corados com verhoeff. Imagens dos cortes foram capturadas por câmera fotográfica digital (Infinity Capture Imaging Software, Lumenera, Ottawa, Canada), acoplada a um microscópio óptico (Nikon Optiphot-2, Tokyo, Japão). As imagens foram transferidas para o *software* Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics Inc, Bethesda, USA), onde as áreas e espessuras das camadas da aorta foram determinadas.

3.5. Imuno-histoquímica

3.5.1. Detecção de α -actina

A identificação de α -actina foi realizada através do anticorpo monoclonal anti- α -actina de músculo liso de rato (Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA) e do kit *Streptavidin-Biotin-Alcaline Phosphatase* (Dako, Carpinteria, EUA). Após a

desparafinização, recuperação de antígenos e bloqueio da biotina endógena do tecido como descrito no item anterior, as lâminas foram incubadas com soro de cavalo (Vector, Burlingame, EUA), diluído 70 vezes em TBS, por 30 minutos, e após a retirada do excesso do soro, foram incubadas com imunoglobulina anti- α -actina de músculo liso, diluída 800 vezes em TBS, durante a noite à 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas durante 45 minutos com anticorpo de cavalo anti-camundongo biotinilado, adsorvido em rato (Vector, Burlingame, EUA), diluído 200 vezes em TBS.

Após lavagem de 5 minutos em TBS, as lâminas foram incubadas com o complexo estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina por 30 minutos, lavadas novamente em TBS e submetidas à revelação. A solução de revelação contendo substrato para a fosfatase alcalina e *fast-red* como descrito no item anterior. A revelação foi acompanhada sob microscopia óptica em aumento de 100x e as células positivas apresentaram coloração avermelhada. O tempo de revelação foi de aproximadamente 12 minutos. Finalmente, as lâminas foram contra coradas e montadas como descrito no item anterior.

3.5.2. Detecção da proliferação celular

A identificação de células em proliferação foi realizada através da marcação de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*, Dako, Carpinteria, USA) utilizando o kit LSAB-HRP (*Labeled Streptavidin-Biotin Horseradish Peroxidase*). Para a realização da técnica foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-PCNA de rato produzido em camundongo (Dako, Carpinteria, USA). Após

a desparafinização e recuperação de antígenos, a peroxidase endógena do tecido foi bloqueada com *Peroxidase Block Solution* (Dako Co, Glostrup, Dinamarca) por 15 minutos, seguido de lavagem com TBS por 5 minutos.

A biotina endógena do tecido foi bloqueada como descrito anteriormente, e os fragmentos foram então incubados com *Protein Block Solution* (Dako Co, Glostrup, Dinamarca) por 15 minutos para bloqueio de antígenos inespecíficos. Os fragmentos foram então incubados com o anticorpo diluído 200 vezes em TBS, durante a noite à 4 °C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com o *pool* de anticorpos biotinilados anti-camundongo, ant-coelho e anti-cabra (Dako, Carpinteria, USA), por 30 minutos.

As lâminas foram lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas por 30 minutos com o complexo *Streptavidin-Biotin-HRP* do kit. As lâminas foram novamente lavadas com TBS e submetidas à revelação com *DAB⁺ Chromogen kit* (Dako, Carpinteria, USA) por 12 minutos. O tecido foi contra corado por 7 minutos em *Methyl Green* (Dako, Carpinteria, USA) e as lâminas foram montadas como descrito no item anterior.

3.5.3. Detecção de macrófagos e linfócitos T

Os macrófagos foram identificados na aorta através do anticorpo monoclonal anti-monócito/macrófago de rato (anti-ED-1) (Serotec, Raleigh, EUA), produzido em camundongo. Para a identificação de linfócitos T foi utilizado o anticorpo de camundongo anti-linfócito T de rato (anti CD-43) (Serotec, Raleigh, EUA).

O método de imuno-histoquímica utilizado para a marcação deste anticorpo foi o LSAB-AP (*Labeled Streptavidin-Biotin Alkaline Phosphatase* – Dako, Carpinteria, USA). Todo o processo foi realizado em câmara úmida.

Com o objetivo de aumentar a expressão antigênica, após a desparafinização, as lâminas foram imersas em tampão citrato 10 mM, pH=6,0 e levados em forno micro-ondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2400 watts durante 15 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com água destilada para a retirada do tampão citrato e transferidas para TBS (*Tris buffered saline*, pH=7,6).

Para o bloqueio da biotina endógena, os cortes foram incubados com solução de avidina D (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 minutos, sendo posteriormente lavadas com TBS durante 5 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com uma solução de biotina (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 minutos e posteriormente lavados com TBS por 5 minutos. Os cortes foram então incubados com soro de cavalo (Vector, Burlingame, EUA), diluído 70 vezes em TBS, durante 30 minutos e, após a retirada do excesso do soro, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-ED-1 (1:200) ou anti-CD43 (1:100), durante a noite, a 4°C.

No dia seguinte, os cortes foram lavados em TBS por 5 minutos e incubados com o *pool* de anticorpos biotinilados anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako, Carpinteria, USA) por 30 minutos. Após lavagem com TBS, para completar a reação, os cortes foram incubados com o complexo

estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina (Dako, Carpinteria, EUA) por 30 minutos e lavados novamente com TBS e destinados à revelação.

Para a revelação, os cortes foram incubados com uma solução contendo substrato para a enzima fosfatase e o corante *fast-red* (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, EUA), preparada da seguinte maneira: 1 mg de fosfato de naftol AS-MX (Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA) foram diluídos em 100 µL de dimetilformamida (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, a solução foi diluída em 4,9 mL de tampão Tris 0,1M (pH=8,2) e 10 µL de levamisol 1M (Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA) foram acrescentados. Esta solução ficou armazenada a -20°C e, no momento da revelação, foi misturada com 5 mg do corante *fast-red*.

A revelação foi realizada sob microscopia em aumento de 100X e as células positivas apresentaram coloração avermelhada. O tempo de revelação foi de aproximadamente 15 minutos. As lâminas foram contra-coradas com hemalunbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 2 minutos, lavadas em água destilada e montadas com glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.6. Análise da apoptose

Para a detecção de células apoptóticas no enxerto de aorta foi utilizada a técnica de TUNEL (*TdT-mediated X-dUTP nick end labeling*). Para tal procedimento, foi utilizado o kit *ApopTag Plus Peroxidase* (Chemicon, EUA).

Esta técnica consiste na marcação da extremidade 3'OH de oligonucleotídeos originados da fragmentação de DNA durante o processo de apoptose celular. Os fragmentos de DNA são submetidos a polimerização pela enzima terminal transferase, que acrescenta nucleotídeos marcados com uma molécula de digoxigenina. Esta é reconhecida por um anticorpo marcado com a enzima peroxidase, que é revelada com diaminobenzidina (DAB), gerando uma coloração marrom. A técnica detalhada esta descrita a seguir.

O tecido vascular foi desparafinado (descrito anteriormente), seguido de incubação de proteinase K (20µg/mL) durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em PBS durante 60 minutos. Em seguida, o excesso de bloqueio foi retirado e acrescentado solução de equilíbrio por aproximadamente 1 minuto.

As lâminas foram incubadas com enzima terminal desoxinucleotídeo transferase (TdT) na diluição de 1:7 em tampão do kit. A incubação foi feita em câmara úmida por 60 minutos a 37°C, ao final das quais as lâminas foram imersas em solução de parada por 10 minutos.

Na etapa seguinte, as lâminas foram incubadas com anticorpo anti-digoxigenina conjugado com enzima peroxidase, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Foram realizadas quatro lavagens das lâminas em PBS e, em seguida, foi feita revelação da enzima com DAB, acompanhada a luz do microscópio e interrompida por volta de 6 minutos em tampão. Por fim, as lâminas foram

contra coradas com verde de metila a 0,5% (Merck, Darmstadt, Alemanha), montadas em gelatina glicerizada. As células positivas neste tipo de reação (TUNEL) apresentam cor marrom/acastanhado e correspondem as células em apoptose.

3.7. Quantificação dos resultados

A quantificação de macrófagos, linfócitos T, proliferação celular e apoptose foi realizada com microscopia óptica sob o aumento de 400X. Tais análises consistiram na quantificação de células positivas nas camadas da aorta. A partir dos valores encontrados, estabeleceu-se relação das células positivas/área total do compartimento. A análise da expressão de α -actina nas camadas da aorta foi determinada utilizando-se o *software* Image-Pro Plus 7.0, onde a área marcada nas diferentes camadas da aorta foi determinada e expressa como porcentagem em relação à área total.

3.8. PCR em tempo real

3.8.1. Síntese de cDNA e PCR em tempo real

Todas as soluções utilizadas para a extração de RNA foram feitas com água deionizada através do sistema Milli-Q (Millipore, Milli-Q Element A10 System, Massachusetts, EUA) e tratada com dietilpirocarbonato (Sigma, Sto Louis, EUA). Para cada litro de água deionizada, foram adicionados 1,0 mL de dietilpirocarbonato e a solução foi mantida a 60°C sob agitação por

aproximadamente 12 horas, sendo em seguida autoclavada (121°C por 20 minutos). RNA total foi extraído do tecido com o reagente Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante. Cada 100 mg de tecido foi homogenizado com 1 mL de Trizol com auxílio de um dispersador de tecidos (IKA – Labortechnik Ultra Turrax T25 Janke & Kunkel, Alemanha). A cada mL de homogenato, foram adicionados 200µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha), a mistura foi novamente homogeneizada e mantida por 3 minutos a temperatura ambiente.

Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 12.000g a 4°C por 20 minutos. A fase superior contendo RNA foi transferida para um microtubo de 2mL contendo o mesmo volume de isopropanol gelado (Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA). As amostras foram centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, o pellet de RNA foi ressuspenso em 1mL de etanol 70% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e centrifugado novamente a 12.000g por 10 minutos. Este procedimento foi repetido e o pellet foi reconstituído com 100µL de água previamente tratada com dietilpirocarbonato.

A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Marietta, EUA) medindo-se absorbância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Foi feito o cálculo da concentração de RNA, expresso em µg/mL, a partir da absorbância à 260 nm. A leitura de 1 OD corresponde a uma solução pura de RNA em fita-simples na concentração de 40 µg/mL. A leitura a 280 nm foi utilizada para determinar a contaminação das amostras

com proteínas. A análise foi feita baseando-se na razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm e o valor aceitável foi de 1,7 a 2,0.

Síntese de cDNA: Todos reagentes utilizados para a reação de síntese do DNA complementar (cDNA) foram da marca Promega (Promega, San Luis Obispo, EUA). Um microlitro de *oligo dT primer* (500 µg/ml) foi misturado a 11µl de uma solução de RNA a 80 ng/µl. A solução foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 4µl de tampão [5X] (Tris-HCl 250 mM pH=8,3, KCL 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2µl de DTT 0,1M, 1µl de dNTP Mix (10mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e 1µl (200u) da enzima transcriptase reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus). A reação foi realizada a 42°C por 50 minutos, passando posteriormente por um período de 15 minutos a 70°C para a inativação da enzima. O cDNA foi mantido em freezer a -20°C até a realização da reação de PCR em tempo real.

PCR em tempo real: Para esta etapa, foram confeccionados pares de primers para a obtenção de amplicons com no máximo 250 pb, conforme recomendação para PCR em tempo real. Os primers utilizados estão representados na **Tabela 1**.

Para o PCR em tempo real foi utilizado o kit SYBR GreenEr qPCR SuperMix Universal (Invitrogen, Califórnia, EUA). Um microlitro de cDNA foi acrescido a 7,5 µL de mix do kit, 0,6 µL de *primer forward* (10 µM), 0,6 µL de *primer reverse* (10 µM), 5,75 µl de água deionizada e 0,15 µl de Rox. Todas as reações foram realizadas em triplicatas. A mistura foi aquecida a 50°C por 10

minutos e depois a 95°C por 5 minutos, seguindo 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A curva de *melting* foi feita à 65°C, com variação de 1°C.

O equipamento utilizado foi o StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapura). A expressão gênica foi determinada como a expressão relativa entre o gene alvo e o gene *housekeeping* β -actina, calculadas pelo *software* do aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapura), a partir dos *threshold cycle* (CT) das reações.

Cálculo dos resultados: Em relação a análise dos resultados do PCR em tempo real foi utilizado o método ΔC_T , que utiliza a seguinte fórmula: $\Delta C_T = C_T$ gene alvo – C_T gene endógeno; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ do gene alvo – ΔC_T do gene endógeno. O número de vezes que ocorre a mudança da expressão gênica é calculado como $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak et al, 2001). Ou seja, após a obtenção dos valores de *cycle threshold* (CT) de cada amostra referente ao gene alvo, foi determinada a diferença de CT entre o gene constitutivo e o gene de interesse. Em seguida, foi realizada a normalização dos valores encontrados sendo que para o resultado final, foi calculado o logaritmo da média dos valores normalizados. O erro padrão foi calculado a partir dos valores normalizados de CT.

Tabela 1. Sequência dos *primers* (*forward e reverse*) utilizados nas reações de PCR em tempo real

Genes	Primers (5' – 3')	Produto (pb)
TNF-α	5' TGGCCCAGACCCTCACACTCA 3'	541
	5' GGCTCAGCCACTCCAGCTGC 3'	
IL-1β	5' CCTTGTGCAAGTGTCTGAAGCAGC 3'	248
	5' GCCACAGCTTCTCCACAGCCA 3'	
IL-6	5' CCGGAGAGGAGACTTCACAGAGGA 3'	71
	5' AGCCTCCGACTTGTGAAGTGGTATA 3'	
IL-2	5' GCAGCTCGCATCCTGTGTT 3'	56
	5' TGGGTGCGCTGTTGACAA 3'	
IFN-γ	5' TCTGGAGGAACTGGCAAAAGGA 3'	87
	5' TCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGGTAGA 3'	
IL-4	5' TGGGTCTCAGCCCCACCTT 3'	71
	5' TCCGTGGATACCGTTCCCGGT 3'	
IL-10	5' TCAGTCACATTTGTTTTCTGCAAA 3'	65
	5' CTGCAAAAGTGGAGCAGTCATT 3'	
β-actina	5' AGGAGTACGATGAGTCCGGCCC 3'	70
	5' GCAGCTCAGTAACAGTCCGCCT 3'	

3.9. Análise de citocinas por ensaios MULTIPLEX/LUMINEX

A quantificação das citocinas foi realizada através do método multiplex/luminex com o kit MILLIPLEX® MAP (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). O ensaio foi realizado no fragmento de aorta, no soro e no sobrenadante dos ensaios descritos anteriormente.

O painel *Rat* (cytokine/chemokine - *immunoassay*), anticorpos para quantificar as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, INF- γ , IL-4 e IL-10 foi utilizado. Todo ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo do fabricante.

Inicialmente, para a extração da proteína total, o fragmento de aorta foi pulverizado em pistilo de vidro em nitrogênio líquido e ressuspensos em 1mL de tampão de lise de proteína (*RIPA Buffer*, Millipore®) contendo inibidor de protease, 1 μ g/mL, de aprotinina, 1 μ g/mL de leupeptina e 1 mmol/mL de PMSF. Em seguida, as amostras foram deixadas em repouso por 30 minutos a 4 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então coletado e acondicionado a -80 °C até o momento das dosagens.

O filtro da placa contendo 96 poços foi lavado com *Bioplex Wash Buffer*. Em seguida, foram adicionadas *beads* conjugadas com os anticorpos anti-citocinas e lavados com *Bioplex Wash Buffer*, sendo posteriormente adicionadas as amostras preparadas previamente.

As amostras permaneceram então incubadas por 2 horas e, posteriormente, foram novamente lavadas com *Bioplex Wash Buffer*. Em seguida, foi adicionado em cada poço anticorpo biotinilado para detecção do epítipo diferente da citocina e incubados por 1 hora. Novas lavagens foram realizadas com *Bioplex Wash Buffer* com ressuspensão dos *beads* que foram analisados pelo *Bioplex Suspension Array System/Luminex* (Bio-Rad) utilizando o *Software Bio-Plex Manager*, versão 4.0 (Bio-Rad).

3.10. Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA) para detecção do NF- κ B

Este ensaio consiste na reação de ligação de proteínas de extrato nuclear com uma sequência de nucleotídeos específica para o fator de transcrição, sendo esta previamente marcada com ^{32}P pela T₄ polinucleotídeo quinase. Quando o meio reacional é submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, a sonda livre (oligonucleotídeo) migra mais que a sonda ligada ao fator nuclear (banda de retardo).

3.10.1. Extração de proteínas nucleares

O método usado para extração de proteínas nucleares foi baseado nos experimentos de Santana e cols [Santana et al., 2010]. As células foram coletadas em PBS gelado e centrifugadas a 2000g x 5 minutos x 4°C e o pellet foi ressuscitado em 400 μ L de tampão de lise (HEPES 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; leupeptina 2 μ g/mL; antipaína 2 μ g/mL; 0,5 mM PMSF; 0,1 mM EDTA) e incubado em gelo durante 15 minutos. Foi adicionado em seguida 10 μ L de NP-40 0,5% com agitação vigorosa, centrifugando-se a 13000 g por 30 segundos a 4°C e o sobrenadante será descartado. O pellet foi ressuscitado em 20 μ L de tampão de extração (HEPES 20 mM; MgCl₂ 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; leupeptina 2 μ g/mL; antipaína 2 μ g/mL; PMSF 0,5 mM) e incubado 20 minutos em gelo sob agitação, centrifugando o extrato à 13000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi

recolhido e a concentração de proteínas determinada, estocando as amostras a -80°C.

Ensaio de competição supershift: Os ensaios *supershift* foram realizado nas mesmas condições para detecção do NFκB. A única diferença é a inclusão de uma etapa adicional que consiste na incubação das proteínas nucleares com anticorpos específicos para cada subunidade (anti-p50 e anti-p65) por 45 minutos, antes da incubação com o tampão de ensaio. As demais etapas foram realizadas sem alterações.

3.10.2. Marcação da sonda

O oligonucleotídeo de DNA contendo a sequência (5' - AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C - 3') foi marcado com a adição de γ -³²P ATP numa solução contendo tampão T4 quinase, T4 quinase e água nas concentrações de: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1 U/μL de T4 quinase, 1 μL de γ -³²P ATP (3 Ci/mmol), 1 μL de tampão T4 *Kinase Buffer* (10x) em 10 μL de volume de reação. Após incubação à 37°C por 10 minutos, o excesso de γ -³²P ATP foi retirado com resina Sephadex G-25. Foram colocadas colunas (Microspin G-25) em um tubo de microcentrifuga, centrifugando-se por 1 minuto a 3000 rpm. A coluna foi transferida para um novo tubo aplicando-se a sonda marcada no centro da resina. Após centrifugação o eluato foi recolhido, e no dia do ensaio a atividade da sonda foi determinada, usando no ensaio aproximadamente 30000 cpm/μL.

3.10.3. Reação de ligação e corrida do gel

Foram adicionados a um tubo 4µL de tampão de ligação 5x (MgCl₂ 5mM; EDTA 2,5mM; DTT 2,5mM; NaCl 300mM; Tris-HCl 50mM pH 7,5; Poly dIdc 0,25µg/µL e glicerol 20%); extrato nuclear em quantidade suficiente para 5µg de proteína; oligo frio em excesso; e H₂O q.s.p. para 20µL de volume final (contando com a adição da sonda marcada).

O tubo foi então incubado por 20 minutos a temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada (1µL), e novamente o tubo foi incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de 1µL de Azul de Bromofenol ao controle negativo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5% (acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)). Para a eletroforese foi usado um tampão de corrida consistindo em 0,5 x TBE (1 x TBE = Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM). O gel correu por volta de 2 horas a 150-160 volts. Ao final da corrida, o gel foi secado procedendo-se em seguida a exposição do filme ao gel em cassete a -80°C.

3.11. Análise estatística

Os dados contínuos de cada variável foram inicialmente comparados com a curva normal através do teste de distância K-S e de Shapiro-Wik e classificados em paramétricos e não paramétricos. Os dados paramétricos foram representados através de média e desvio padrão da amostra, os grupos

independentes comparados entre si através do teste Análise de Variância para medidas não repetidas, com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

Quando os dados não foram paramétricos estes foram representados através de mediana e quartil inferior (percentil 25) e quartil superior (percentil 75) e os grupos independentes comparados entre si através do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Müller-Dunn.

Foi realizado Teste de Correlação de Spearman entre variáveis não categóricas sendo considerando além da significância (p) o valor do índice de correlação (r), sendo os valores de $r \geq 0,5$ como de boa correlação e aqueles menores que este valor como de fraca correlação. Foi considerado para o estudo risco $\alpha \leq 5\%$ de cometer erro tipo I ou de 1ª espécie e $\beta \leq 5\%$ de cometer erro tipo II ou de 2ª espécie. Foi utilizado o programa SPSS® 19.0 da IBM® Corporation.

Todos os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão. A significância estatística foi considerada a partir do $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Transplante de aorta

4.1.1. Modelo experimental de transplante de aorta

A padronização do modelo experimental de transplante de aorta, foi baseado na descrição de Mennander e Dambrin [Mennander et al., 1991 e Dambrin et al., 1999].

A maior dificuldade encontrada para a padronização deste modelo ocorreu na técnica para confecção das anastomoses. Nos treinamentos iniciais, os tempos gastos para a confecção das anastomoses (proximal e distal) não eram adequados, pois alguns animais ficavam paraplégicos devido ao tempo de isquemia. O problema foi solucionado com diminuição desse tempo, que passou de 40 minutos para cerca de 30 minutos, após intensivos treinos.

Outra dificuldade superada foi em relação ao controle do sangramento entre os pontos das anastomoses após a retirada dos clampes vasculares. Conforme o aprimoramento da técnica, o sangramento foi evitado, pois os pontos utilizados foram confeccionados perfeitamente equidistantes entre si, permitindo uma perfeita coaptação das bordas do enxerto. Além disso, a túnica adventícia deve ser cuidadosamente dissecada a fim de não comprometer a sustentação da parede do vaso após o implante do enxerto no receptor.

Vale ressaltar que devido ao alto grau de dificuldade na dissecação do vaso e na confecção das anastomoses, para a padronização da técnica cirúrgica de

transplante de aorta é necessário ter um laboratório bem estruturado com equipamentos e instrumental cirúrgico especializado. O modelo experimental de transplante de aorta está ilustrado na **Figura 2**.

Figura 2. Modelo experimental de transplante de aorta. **(A)** A aorta do receptor foi dividida entre 2 clampes; o enxerto doador foi posicionado entre os cotos vasculares para posterior implante (seta); **(B)** A aorta do doador foi conectada na posição ortotópica; as anastomoses foram realizadas com pontos simples equidistantes entre si (círculo); **(C)** Os clampes foram retirados e o fluxo sanguíneo foi restabelecido; **(D)** Aspecto macroscópico do enxerto de aorta do grupo ALO 30 dias pós-transplante.

4.1.2. Histologia

A coloração por Verhoeff foi utilizada para a avaliação das alterações estruturais em todas túnicas do vaso. A **Figura 3 (A1, B1 e C1)** traz o aspecto geral do enxerto nos diferentes grupos 30 dias pós-transplante.

Os animais do grupo ISO, apresentaram discreta formação de neoíntima, enquanto as túnica média e adventícia não apresentaram alterações estruturais (**Figura 3A2**).

Já os animais do grupo ALO, desenvolveram lesão vascular do enxerto caracterizada por exacerbada formação de neoíntima, observado de forma difusa e concêntrica, causando obstrução da luz vascular. Analisando-se a túnica média, observou-se diminuição significativa de sua área, acompanhada por ruptura e perda da conformação estrutural das fibras elásticas. Além disso, a análise da túnica adventícia também revelou um aumento significativo de sua área (**Figura 3B2**).

O tratamento com talidomida atenuou de forma significativa a formação da camada neoíntima, bem como o aumento das área da média e adventícia, em relação aos animais do grupo ALO (**Figura 3C2**).

Analisando-se as áreas das camadas neoíntima e média, observou-se que a relação entre área da íntima/área da média, foi significativamente mais elevada no grupo ALO em relação ao grupo ISO, enquanto que nos animais tratados com talidomida, a relação entre área da íntima/área da média foi significativamente menor em relação aos animais do grupo ALO,

apresentando valores numericamente semelhantes ao grupo ISO. Os resultados estão expressos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Análise histológica das camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.

PARÂMETROS	GRUPOS		
	ISO (n=8)	ALO (n=8)	ALO+TALID (n=8)
Área da Luz (μm^2)	5,6 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,3*	4,6 $\pm$ 0,7 [#]
Área da Neoíntima (μm^2)	0,1 $\pm$ 0,0	2,3 $\pm$ 0,3*	1,1 $\pm$ 0,2* [#]
Espessura da Neoíntima (μm)	19,1 $\pm$ 7,6	209,4 $\pm$ 35,5*	116,5 $\pm$ 18,2* [#]
Área da Média (μm^2)	2,4 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,1
Espessura da Média (μm)	130,4 $\pm$ 5,4	96,0 $\pm$ 6,9*	108,3 $\pm$ 4,5* [#]
Área da Adventícia (μm^2)	4,2 $\pm$ 0,7	14,3 $\pm$ 2,0*	10,9 $\pm$ 1,2*
Espessura da Adventícia (μm)	249,3 $\pm$ 33,3	546,0 $\pm$ 89,3*	363,5 $\pm$ 21,8* [#]
Área Neoíntima/Média (μm^2)	0,03 $\pm$ 0,02	1,18 $\pm$ 0,17*	0,44 $\pm$ 0,07 [#]
Espessura Neoíntima/Média (μm)	0,2 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,3*	1,1 $\pm$ 0,2* [#]

*p<0,05 vs. ISO; [#]p<0,05 vs. ALO

Figura 3. Histologia para Verhoeff no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. **(A1-A2)** ISO; **(B1-B2)** ALO e **(C1-C2)** ALO+TALID. Aumento X40 e X400 (respectivamente).

4.1.3. Imuno-histoquímica

Os resultados das análises por imuno-histoquímica do enxerto de aorta são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Análise por imuno-histoquímica e TUNEL nas camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.

PARÂMETROS	GRUPOS								
	ISO (n=8)			ALO (n=8)			ALO+TALID (n=8)		
	Neoíntima	Média	Adventícia	Neoíntima	Média	Adventícia	Neoíntima	Média	Adventícia
α-actina (%)	5±1	82±4	1±0 [#]	32±5*	5±1*	18±1	3±2 [#]	9±2*	3±0 [#]
PCNA (cels/mm ²)	0	1±0	0	11±2*	7±2*	3±1*	5±2* [#]	2±1* [#]	1±0* [#]
ED-1 (cels/mm ²)	0	0	0	164±24*	204±37*	63±8*	98±33* [#]	85±25* [#]	32±10* [#]
CD-43 (cels/mm ²)	0	0	0	71±12*	15±2*	29±5*	26±7* [#]	4±1* [#]	16±3* [#]
TUNEL (cels/mm ²)	0	1±1	1±1	16±6*	26±6*	43±8*	4±2* [#]	13±6* [#]	7±1* [#]

*p<0,05 vs. ISO; [#]p<0,05 vs. ALO.

4.1.3.a) α -actina: No grupo ISO, foi detectada expressão de α -actina somente na camada média do vaso, indicando a expressão constitutiva desta proteína na musculatura lisa vascular (**Figura 4A**). No grupo ALO houve aumento significativo da expressão de α -actina nas camadas neoíntima e adventícia, comparados com os animais do grupo ISO. Por outro lado, os animais do grupo ALO, apresentaram uma diminuição significativa da expressão de α -actina na camada média (**Figura 4B**). O tratamento com talidomida promoveu redução significativa da expressão de α -actina nas camadas neoíntima e adventícia. No entanto, o tratamento com talidomida não influenciou na expressão de α -actina na camada média (**Figura 4C**).

Figura 4. Imuno-histoquímica para expressão de α -actina no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. (A) ISO; (B) ALO e (C) ALO+TALID. Aumento X400.

Figura 5. Análise comparativa da expressão de α -actina nas camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. *p<0,05 vs. ISO; #p<0,05 vs. ALO.

4.1.3.b) Proliferação celular: A atividade proliferativa nas camadas do vaso foi detectada através da expressão de PCNA. O grupo ISO apresentou mínima atividade proliferativa somente na camada média (**Figura 6A**). No grupo ALO, o número de células em proliferação mostrou-se significativamente aumentado em todas as camadas do enxerto de aorta, com predomínio nas camadas neoíntima e média (**Figura 6B**). O tratamento com talidomida reduziu significativamente a atividade proliferativa em todas as camadas do aloenxerto vascular (**Figura 6C**).

Figura 6. Imuno-histoquímica para atividade proliferativa (PCNA⁺) no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. (A) ISO; (B) ALO e (C) ALO+TALID. Aumento X400.

Figura 7. Análise comparativa de atividade proliferativa (PCNA⁺) nas camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. *p<0,05 vs. ISO; #p<0,05 vs. ALO.

4.1.3.c) Macrófagos: Nos animais do grupo ISO, não foram detectados macrófagos nas camadas do enxerto de aorta (**Figura 8A**). No entanto, os animais do grupo ALO, apresentaram aumento significativo do número de macrófagos em todas as camadas do aloenxerto de aorta. Esse infiltrado foi predominante nas camadas neoíntima e média (**Figura 8B**). O tratamento com talidomida promoveu uma diminuição significativa na infiltração de macrófagos em todas as camadas do aloenxerto de aorta. Tal fenômeno, teve efeito mais acentuado na camada média (**Figura 8C**).

Figura 8. Imuno-histoquímica para macrófagos (ED-1+) no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. (A) ISO; (B) ALO e (C) ALO+TALID. Aumento X400.

Figura 9. Análise comparativa de macrófagos (ED1+) nas camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. *p<0,05 vs. ISO; #p<0,05 vs. ALO.

4.1.3.b) Linfócitos T: Não foi detectada a presença de infiltrado linfocitário nas camadas do enxerto vascular dos animais do grupo ISO (**Figura 10A**). Em contraste, os animais do grupo ALO apresentaram um elevado número de linfócitos T em todas as camadas do aloenxerto de aorta, com predomínio na camada neoíntima (**Figura 10B**). O tratamento com talidomida reduziu significativamente o número de linfócitos T no aloenxerto de aorta, em relação aos animais do grupo ALO. Este efeito foi mais acentuado na camada neoíntima (**Figura 10C**).

Figura 10. Imuno-histoquímica para linfócitos T (CD-43⁺) no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. (A) ISO; (B) ALO e (C) ALO+TALID. Aumento X400.

Figura 11. Análise comparativa de linfócitos T (CD43⁺) nas camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. *p<0,05 vs. ISO; #p<0,05 vs. ALO.

4.2. Análise da apoptose

No grupo ISO foram observadas poucas células em apoptose nas camadas do enxerto de aorta, as quais foram identificadas pela técnica de TUNEL (**Figura 12A**). Por outro lado, o número de células em apoptose no aloenxerto de aorta do grupo ALO revelou um aumento significativo em todas as camadas do vaso, com aumento mais acentuado na camada adventícia (**Figura 12B**). O tratamento com talidomida diminuiu significativamente as células em apoptose em todas as camadas do aloenxerto de aorta, particularmente na camada adventícia (**Figura 12C**). Os dados das análises das células em apoptose estão expressos na **Tabela 3**.

Figura 12. Imuno-histoquímica para apoptose (TUNEL⁺) no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. **(A)** ISO; **(B)** ALO e **(C)** ALO+TALID. Aumento X400.

Figura 13. Análise comparativa em apoptose (TUNEL⁺) nas camadas do enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. *p<0,05 vs. ISO; #p<0,05 vs. ALO.

4.3. Análise dos mediadores inflamatórios no enxerto de aorta

Com intuito de identificar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na vasculopatia crônica do transplante associado ao tratamento com talidomida no modelo de transplante de aorta, mediadores inflamatórios foram avaliados através de PCR em tempo real e ensaios MULTIPLEX/LUMINEX no vaso. Foram quantificadas as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-2 e IFN- γ , além das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. Os resultados estão expressos na **Figura 14**.

Figura 14. Análise comparativa da expressão gênica e da concentração das citocinas no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. * $p < 0,05$ vs. ISO; # $p < 0,05$ vs. ALO.

Figura 14. Análise comparativa da expressão gênica e da concentração das citocinas no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. * $p < 0,05$ vs. ISO; # $p < 0,05$ vs. ALO.

De uma maneira geral, a análise comparativa da expressão gênica e da concentração das citocinas no enxerto vascular, não revelaram aumento significativo nos animais do grupo ISO.

Diferentemente do grupo ISO, nos animais do grupo ALO foi observado um acentuado aumento das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2 e INF- γ no aloenxerto vascular, refletindo um intenso estado pró-inflamatório local. Outra observação importante a ser destacada, foi o aumento significativo de IL-10, indicando imunorregulação local da resposta inflamatória.

Os animais tratados com talidomida apresentaram diminuição das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2 e INF- γ , bem como aumento das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 no enxerto vascular, corroborando as propriedades imunomodulatórias que talidomida possui. Os resultados estão expressos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Análise da expressão gênica e da concentração tecidual dos mediadores inflamatórios no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante.

CITOCINAS	GRUPOS					
	ISO		ALO		ALO+TALID	
	mRNA (expressão relativa)	proteína (pg/ml)	mRNA (expressão relativa)	proteína (pg/ml)	mRNA (expressão relativa)	proteína (pg/ml)
TNF-α	1,0 $\pm$ 0,9	15 $\pm$ 5	147 $\pm$ 12*	613 $\pm$ 43*	2,1 $\pm$ 1,3 [#]	87 $\pm$ 33 [#]
IL-1β	1,0 $\pm$ 0,3	225 $\pm$ 123	11,4 $\pm$ 1,2*	1230 $\pm$ 109*	0,5 $\pm$ 0,3 [#]	874 $\pm$ 204 [#]
IL-6	1,0 $\pm$ 0,3	387 $\pm$ 73	5,9 $\pm$ 1,2*	2158 $\pm$ 122*	2,7 $\pm$ 0,6 [#]	1210 $\pm$ 371**
IL-2	1,0 $\pm$ 0,2	34 $\pm$ 29	1,2 $\pm$ 0,4	195 $\pm$ 16*	0,3 $\pm$ 0,1	112 $\pm$ 19**
IFN-γ	1,0 $\pm$ 0,9	0	9,6 $\pm$ 3,0*	139 $\pm$ 44*	2,4 $\pm$ 1,4 [#]	25 $\pm$ 10*
IL-4	1,0 $\pm$ 0,5	18 $\pm$ 9	1,0 $\pm$ 0,8	48 $\pm$ 20	6,1 $\pm$ 0,7**	90 $\pm$ 15*
IL-10	1,0 $\pm$ 0,4	151 $\pm$ 31	3,2 $\pm$ 0,5*	338 $\pm$ 33*	5,5 $\pm$ 0,8**	284 $\pm$ 60*

*p<0,05 vs. ISO; #p<0,05 vs. ALO.

4.4. Concentração sérica dos mediadores inflamatórios

A fim de avaliar a repercussão sistêmica da resposta inflamatória neste modelo experimental, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-2, INF- γ e as anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 foram dosadas no soro dos animais através de ensaios MULTIPLEX/LUMINEX.

Não foram detectadas presença de IL1- β , IL-6 e IL-4 no soro dos animais. Por outro lado, a análise das concentrações séricas de TNF- α , IL-2, INF- γ e IL-10 revelaram aumento significativo nos animais do grupo ALO em relação aos animais do grupo ISO. No entanto, os animais tratados com talidomida apresentaram redução significativa da concentração sérica de TNF- α , IL-2, INF- γ quando comparados com o grupo ALO. A concentração sérica de IL-10, por sua vez, aumentou de forma significativa no grupo ALO+TALID quando comparados aos grupos ALO e ISO. Os resultados estão expressos na **Tabela 5**.

Tabela 5. Análise da concentração sérica dos mediadores inflamatórios nos deferentes grupos 30 dias pós-transplante.

Parâmetros (pg/ml)	ISO	ALO	ALO+TALID
TNF-α	0,5 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,3*	0,6 $\pm$ 0,1 [#]
IL-2	11,2 $\pm$ 4,1	124,1 $\pm$ 11,0*	16,1 $\pm$ 2,0 [#]
INF-γ	55,2 $\pm$ 11,3	140,2 $\pm$ 26,1*	45,1 $\pm$ 13,2 [#]
IL-10	0,6 $\pm$ 0,1	11,2 $\pm$ 3,1*	43,1 $\pm$ 13,1* [#]

*p<0,05 vs. ISO; [#]p<0,05 vs. ALO.

4.5. Análise da expressão do NFκB

Para um melhor esclarecimento quanto aos mecanismos moleculares envolvidos na vasculopatia crônica do transplante, foi realizada a análise da expressão do fator de transcrição NFκB pelo método de *Gel-shift* no enxerto de aorta. Os animais do grupo ISO apresentaram bandas pouco visíveis. Em contraste, os animais do grupo ALO apresentaram bandas densas, indicando ativação do fator de transcrição NFκB. Nos animais tratados com talidomida, as bandas mostraram-se rarefeitas e comparáveis às observadas nos animais do grupo ISO, indicando bloqueio da ativação do NFκB pela talidomida (**Figura 15A**). A quantificação das bandas foi feita por densitometria, na qual as diferenças apontadas são mais claramente visíveis (**Figura 15B**).

Figura 15. Quantificação densitométrica do NFκB no enxerto de aorta 30 dias pós-transplante. * $p < 0,05$ vs. ISO; # $p < 0,05$ vs. ALO.

4.6. Análise das subunidades p50 e p65

Na parte superior da figura é possível observar os anticorpos utilizados (anti-p50 e anti-p65). Como representado na figura, em extratos do aloenxerto de aorta (grupo ALO), foram identificados a presença dos anticorpos p50 e p65 na banda, confirmando o envolvimento dos dímeros p50 e p65 neste complexo.

Figura 16. Ensaios de competição *supershift* no aloenxerto de aorta.

5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços alcançados na prática do transplante de órgãos, a vasculopatia crônica do transplante, característica no processo de rejeição crônica ao aloenxerto, ainda representa um importante obstáculo para se alcançar o sucesso dessa modalidade terapêutica a longo prazo [Mitchell et al., 2009; Hillebrands et al., 2005; Religa et al., 2005].

A vasculopatia crônica do transplante, embora seja uma complicação grave e frequente, continua sendo pouco compreendida e sem tratamento específico. Por estes motivos, ensaios pré-clínicos usando fármacos que visem o bloqueio da inflamação e da lesão vascular assumem extrema relevância. Neste contexto, o presente estudo teve como principal objetivo padronizar o modelo experimental de vasculopatia crônica do transplante em transplante de aorta para analisar mecanismos inflamatórios envolvidos neste processo e, também, analisar uma estratégia terapêutica anti-inflamatória e imunomoduladora, com o intuito de bloquear a inflamação e, conseqüentemente, o desenvolvimento deste processo.

Como alternativa terapêutica, o presente estudo utilizou a talidomida, uma droga que apresenta propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias. Introduzida no mercado mundial em 1956 como sedativo/hipnótico, a talidomida ganhou popularidade como uma alternativa aos barbitúricos devido ao seu rápido mecanismo de ação. Na década de 60, após inúmeros relatos de malformações congênitas, a droga foi retirada do comércio.

Mais recentemente, com o reconhecimento de suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso clínico da talidomida para o tratamento do eritema nodoso hansênico [Kim et al., 2011; Walker et al., 2007; Raje et al., 1999], para o tratamento do mieloma múltiplo [Morgan et al., 2013; Singhal et al., 1999], tuberculose, AIDS, bem como alguns tipos de câncer [van de Harst et al., 2011; Wohl et al., 2002; Tramontana et al., 1995].

No presente estudo, com o intuito de estudar os efeitos da talidomida na vasculopatia crônica do transplante, primeiramente, foi padronizado o modelo experimental de transplante de aorta. A técnica cirúrgica foi executada dentro de uma sequência metodológica para viabilizá-lo de forma precisa e reprodutível. Para tanto, alguns procedimentos foram fundamentais e merecem destaque. A exposição e dissecação da aorta teve que ser extremamente cuidadosa, ressecando-se a adventícia em pequena porção com auxílio de pinças, tipo relojoeiro. O campo cirúrgico teve que ser mantido sempre úmido com solução fisiológica 0,9% para evitar danos irreversíveis das estruturas do vaso. Além disso, após o clampeamento, os cotos vasculares tiveram que ser inspecionados e irrigados com solução fisiológica e heparina a fim de eliminar coágulos e eventuais corpos estranhos no lúmen do vaso.

A técnica para confecção das anastomoses vasculares também mereceu destaque. É fundamental iniciar a sutura passando três pontos de reparo colocados em distâncias iguais entre si (a 60°), descrito como Triângulo de Carrel [Dutkowski et al., 2008] evitando, assim, intromissão da adventícia para

dentro da luz do vaso. Esta técnica permite a obtenção de uma anastomose ampla com ângulo agudo que visa diminuir a turbulência do fluxo sanguíneo neste local. Os nós foram confeccionados com auxílio de duas pinças. É fundamental não traumatizar a íntima com as pinças, a fim de se evitar lesões que possam gerar trombos. Para tanto, foi necessário um microscópio automático que ofereceu iluminação própria para minimizar a obscuridade do campo operatório. Vale ressaltar que a utilização de animais com pesos semelhantes impediu desproporções entre os calibres dos vasos do doador e do receptor, evitando estenoses e obstruções que em microcirurgia são bem mais deletérias que em vasos maiores.

Para o desenvolvimento do modelo experimental de vasculopatia crônica do transplante foram realizados transplantes de aorta entre animais de diferentes linhagens isogênicas (Fisher 344 → Lewis) cujas diferenças no complexo MHC e na região RT1 promovem uma resposta imune caracterizada por lesões que mimetizam as alterações que acometem as estruturas dos vasos do aloenxerto durante o processo de rejeição crônica em humanos [Min et al., 2011; Hillebrands et al., 2001]. A presença de espessamento fibro-intimal progressivo e difuso (camada neoíntima, que leva ao estreitamento significativo da luz das artérias com consequente isquemia e falência do órgão transplantado) é a característica central desse modelo. Além disso, destaca-se a participação de mediadores da resposta imune evidenciando a participação da resposta inflamatória local, bem como diversas moléculas envolvidas na patogênese da lesão vascular, tornando o modelo de

vasculopatia crônica do transplante um excelente modelo para o estudo das alterações vasculares observadas durante o processo de rejeição.

Uma vez estabelecido o modelo de vasculopatia crônica do transplante, foram analisadas as alterações morfológicas, a expressão de α -actina, a atividade proliferativa, além dos componentes celulares da inflamação e o fenômeno da apoptose em todas as camadas do enxerto de aorta. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de histologia, de imuno-histoquímica e do TUNEL, as quais permitem detectar, localizar e avaliar as alterações morfológicas e as células envolvidas nesse processo.

As análises histológicas realizadas nos enxertos revelaram, como esperado, que os animais do grupo ISO não apresentaram sinais de rejeição nas camadas do vaso. Em contraste, os animais do grupo ALO desenvolveram lesão vascular com características análogas aos aspectos morfológicos da vasculopatia crônica do transplante, caracterizada por acentuada formação da camada neoíntima.

O crescimento e espessamento das camadas íntima e adventícia durante o desenvolvimento da vasculopatia do transplante é considerado um fenômeno de remodelamento vascular [Zheng et al., 2011]. Tal condição culmina no alargamento ou constrição do vaso. A formação da camada neoíntima é uma característica central desse processo, seja por processos de natureza imunológica ou física, representando essencialmente um fenômeno adaptativo. O balanço entre esses fenômenos determina o grau de espessamento e comprometimento do vaso [Mitchell et al., 2007; Khachigian

et al., 2002]. As alterações da túnica média caracterizaram-se pela diminuição de sua área, provavelmente pela redução do número das VSMC, por necrose ou apoptose [Zheng et al., 2011; Religa et al., 2005]. Além disso, foi possível observar ruptura das fibras elásticas internas e externas, associado a um aumento significativo da área na túnica adventícia. Tais fenômenos corroboram com os descritos na literatura [Mitchell et al., 2007].

Em paralelo aos achados histológicos, o presente estudo analisou a expressão de α -actina no enxerto, através de imuno-histoquímica. Nos animais do grupo ISO, a expressão de α -actina foi identificada somente na camada média do aloenxerto de aorta, indicando expressão constitutiva em VSMC. Nos animais do grupo ALO, foi observado aumento significativo da expressão de α -actina nas camadas neoíntima e adventícia, enquanto que na camada média esta expressão foi baixa ou praticamente nula, sugerindo migração das VSMC para o espaço subendotelial. As VSMC, além de expressarem α -actina, possuem alta capacidade de migração e proliferação na reparação vascular a lesões de diversas naturezas, seja imunoinflamatória, física ou química.

A origem das VSMC durante a formação da neoíntima ainda não foi completamente esclarecida, porém a literatura descreve algumas possibilidades: 1) diferenciação e migração das VSMC da camada média [Zheng et al., 2011; Gerthoffer et al., 2007; Hillebrands et al., 2001]; 2) migração e proliferação de células específicas procedentes das camadas média, adventícia ou da própria camada neoíntima [Ji et al., 2010; Roberts et al., 2005]; 3) aderência, proliferação e diferenciação de células pluripotentes

procedentes da sangue periférico, tais como células progenitoras hematopoiéticas e células progenitoras endoteliais [Roux et al., 2012; Roberts et al., 2005; Sata et al., 2002].

A atividade proliferativa foi analisada pela expressão de PCNA. Nos animais do grupo ISO, pouca ou nenhuma atividade proliferativa foi observada nas diferentes camadas do enxerto vascular. Por outro lado, o grupo ALO apresentou intensa atividade proliferativa em todas as camadas, especialmente na camada neoíntima, refletindo um possível processo inflamatório ativo associado a proliferação das VSMC envolvidos na formação da camada neoíntima [Religa et al., 2005].

Com relação ao infiltrado inflamatório, os animais do grupo ALO apresentaram um aumento significativo de macrófagos e linfócitos T infiltrando todas as camadas do aloenxerto. O elevado número dessas células nas camadas da aorta também observado em outros estudos [Chen et al., 2005; Yu et al., 2000] confirma um intenso processo inflamatório em atividade. O acúmulo de macrófagos e linfócitos T no tecido vascular tem papel fundamental no desenvolvimento da camada neoíntima, pois estas células produzem mediadores inflamatórios e estão diretamente envolvidas nos mecanismos de citotoxicidade, contribuindo para o agravamento da lesão vascular.

Os macrófagos podem agir como APC e também como células efectoras, levando à produção de uma série de mediadores inflamatórios que regulam a resposta imune contribuindo para uma resposta vasculoproliferativa [Roux et al., 2012; Zhou et al., 2005]. Os linfócitos T, por sua vez, estão envolvidos na

resposta imune celular produzindo citocinas como IL-2, INF- γ e IL-4, as quais também têm participação nos mecanismos envolvidos na vasculopatia crônica do transplante [Wollin et al., 2009; Tellides et al., 2000].

O tratamento com talidomida atenuou significativamente a formação da camada neoíntima, acompanhado por uma diminuição tanto da expressão de α -actina como da atividade proliferativa nas camadas do aloenxerto vascular. Em paralelo, a talidomida diminuiu significativamente o número de macrófagos e o número de linfócitos T em todas as camadas do aloenxerto. Em outros modelos experimentais, efeitos semelhantes da talidomida foram descritos, corroborando os achados do presente estudo. Park e cols demonstraram, em modelo de lesão de carótida por cateter balão, resultados benéficos da talidomida na prevenção do desenvolvimento da camada neoíntima e da atividade proliferativa. Em nosso laboratório, as propriedades anti-inflamatória e imunomoduladora da talidomida foram demonstradas em modelo experimental de lesão vascular mecânica de carótida e em modelo de uremia induzido por adenina [Santana et al., 2013, Santana et al., 2010]. Fujita e cols utilizando cultura de macrófagos tratados com LPS relataram a capacidade da talidomida em inibir a biossíntese da ciclooxigenase-2 (Cox-2) e prostaglandina E2 [Fujita et al., 2001]. Com base nessas observações, uma possível explicação para os achados benéficos da talidomida na morfologia do enxerto vascular, na atividade proliferativa, na expressão de α -actina e no infiltrado inflamatório, composto por macrófagos e linfócitos, seria consequência dos efeitos anti-inflamatório e imunomodulador desta droga.

As análises realizadas a partir dos experimentos conduzidos pela técnica de TUNEL revelaram pouquíssimas células em apoptose no enxerto de aorta dos animais do grupo ISO. Por outro lado, a apoptose ocorreu em todas as camadas do aloenxerto dos animais do grupo ALO. Embora a apoptose possa refletir um mecanismo regulatório do sistema imune eliminando células inflamatórias, pode também participar do processo de eliminação de células do aloenxerto resultando em dano do órgão transplantado, especialmente no tecido vascular [Religa et al., 2005]. O tratamento com talidomida atenuou significativamente a apoptose nas camadas do aloenxerto. Este efeito pode ser resultado do bloqueio da produção de TNF- α pela talidomida, considerando que o TNF- α pode induzir citotoxicidade com morte celular por necrose ou por apoptose [Zhang et al., 2009; Wajant et al., 2003].

Com o intuito de identificar e caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na vasculopatia crônica do transplante, citocinas inflamatórias foram analisadas, através da expressão de RNAm, da concentração proteica no enxerto e no soro dos animais estudados. No presente estudo, no enxerto de aorta do grupo ISO, não foi detectado aumento da expressão gênica ou da concentração de citocinas. Em contraste, os animais do grupo ALO apresentaram aumento significativo da expressão de RNAm e da concentração de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ e IL-10 no aloenxerto de aorta. Estes resultados obtidos são semelhantes aos observados em estudos anteriores que também analisaram a presença de mediadores inflamatórios nos modelos experimentais de transplante de aorta e lesão de carótida por cateter balão [Chen et al., 2005; Mitchell et al., 2004; Park et al., 2004; Wollin

et al., 2008; Yacoub-Youssef et al., 2009; Tellides et al., 2000]. A produção local destes mediadores inflamatórios reflete um estado de intensa ativação imunológica, sugerindo que estas citocinas têm participação na gênese da vasculopatia crônica do transplante [Mitchell et al., 2009; Wollin et al., 2009; Yacoub-Youssef et al., 2008; Chen et al., 2005].

Os mecanismos que levam ao aumento dessas citocinas no tecido vascular ainda não foram completamente elucidados. No modelo de transplante alogênico, que culmina com a vasculopatia do transplante, a resposta imune induz ativação do endotélio, que sintetiza e libera um amplo espectro de citocinas que vão agir como mediadores inflamatórios. Citocinas como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 estimulam a produção de moléculas de adesão, tais como E-selectina, P-selectina, ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular), além de quimiocinas. Estes mecanismos facilitam o recrutamento de células inflamatórias como macrófagos e linfócitos, que amplificam a resposta aumentando a produção de citocinas na parede vascular agravando o processo inflamatório. O resultado final de toda esta cadeia de eventos é a organização da resposta inflamatória local com agressão ao aloenxerto, levando ao desenvolvimento da vasculopatia crônica do transplante [Roux et al., 2012; Mitchell et al., 2009, Hillebrands et al., 2005].

Vale ressaltar que citocinas como $\text{TNF-}\alpha$ e a $\text{IL-1}\beta$ são fundamentais na ativação das células T. Essas citocinas ativam linfócitos T e induzem a expressão de moléculas de adesão e moléculas MHC de classe I e classe II.

Além disso, promovem sinais necessários para a produção de IL-2 caracterizando um perfil de resposta imune do tipo Th1.

A IL-6 tem papel relevante como citocina fator pró-inflamatória, embora alguns estudos tenham demonstrado efeitos anti-inflamatórios [Scheller et al., 2011; Xing Z et al., 1998]. A IL-6 induz crescimento e diferenciação de linfócitos T e B, além de induzir aumento na expressão de moléculas de adesão na parede vascular.

O IFN- γ também tem participação importante na patogênese da vasculopatia crônica do transplante, possivelmente pelo seu papel na indução de antígenos MHC de classe I e II envolvidos nos mecanismos de rejeição ao aloenxerto [Mitchell et al., 2009; Mitchell et al., 2007]. Adicionalmente, o IFN- γ é um potente ativador das funções de macrófagos, além de aumentar a atividade citotóxica de células *Natural Killer* (NK) [Tellides et al., 2000]. O IFN- γ estimula a migração e proliferação das VSMC, podendo contribuir para o crescimento e espessamento da camada íntima vascular [Mitchell et al., 2009; Tellides et al., 2000]. Essas observações suportam a hipótese de que o aumento acentuado de IFN- γ no grupo ALO, pode induzir o bloqueio da produção e da proliferação de IL-4 pelos linfócitos T, representando um perfil nitidamente Th1.

O aumento da IL-10 observado no grupo ALO pode estar contribuindo para a supressão local de resposta inflamatória, promovendo um sinal negativo para a síntese de IL-2 e IFN- γ pelos linfócitos T. A IL-10 teria um papel importante deprimindo a atividade de linfócitos T e o recrutamento de células inflamatórias na superfície endotelial, modulando a resposta imune durante a

vasculopatia crônica do transplante [Chen et al., 2005]. Além disso, estudos demonstraram que a IL-10 inibe a ativação e a proliferação das VSMC *in vitro* [Mostefai et al; 2013; Mazighi et al., 2004]. Em resumo, o aumento expressivo de IL-10, embora não acompanhado por um aumento da expressão de IL-4 no grupo ALO, aponta para a participação da regulação da resposta imune através de resposta Th2.

O tratamento com talidomida diminuiu significativamente a expressão gênica e a concentração de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ no aloenxerto vascular, caracterizando os efeitos imunomoduladores da talidomida. De fato, estudos *in vitro* indicam que a talidomida possui a propriedade de diminuir os níveis de TNF- α sintetizados por monócitos e macrófagos, através da degradação do RNA mensageiro [Sampaio et al., 1991; Moreira et al., 1993]. Esse efeito ocorre pela diminuição da meia vida do TNF- α que passa de 30 para 17 minutos, sendo dependente da dose de talidomida [Majumder et al., 2012]. Recentemente, Amirshahrokhi e cols, usando um modelo experimental de lesão pulmonar induzido pela administração de paraquat em camundongos, demonstraram que a talidomida causou diminuição da expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 confirmando seu efeito imunomodulador [Amirshahrokhi et al., 2013].

A talidomida também foi capaz de diminuir a expressão gênica e a concentração proteica de IFN- γ no aloenxerto de aorta. Efeitos da talidomida na expressão de IFN- γ ainda não foram descritos na literatura. No entanto, a habilidade da talidomida em bloquear o IFN- γ fortalece seu efeito anti-inflamatório.

O efeito imunomodulador da talidomida pode ser comprovado através do aumento das citocinas Th2 IL-4 e IL-10 tanto na expressão de RNAm como na concentração proteica no aloenxerto vascular. A presença aumentada de IL-4 e IL-10, padrão Th2, pode ser decorrente da supressão local das citocinas pró-inflamatórias induzida pela talidomida. O aumento dessas citocinas pode promover um sinal negativo para a proliferação de linfócitos T durante o processo de rejeição. A IL-4 e a IL-10 podem ainda inibir a síntese de IFN- γ induzindo diminuição de TNF- α e IL-1 β .

A análise dos níveis séricos das citocinas revelou aumento de TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-10 nos animais do grupo ALO em paralelo aos observados no aloenxerto vascular, refletindo sua repercussão sistêmica. À semelhança do observado no tecido, o tratamento com talidomida promoveu diminuição dos níveis séricos de TNF- α , IL-2 e IFN- γ , e aumento dos níveis de IL-10. Resultados semelhantes foram observados em modelo experimental de uremia induzido por dieta rica em adenina em camundongos [Santana et al., 2013]. Com base na análise integrada dessas observações, pode-se indicar RUIM efeito imunomodulatório da talidomida.

Não foram detectados níveis séricos de IL1- β , IL-6 e IL-4 nos animais do presente estudo. A detecção de níveis séricos de citocinas apresenta algumas limitações importantes que devem ser ressaltadas. Em primeiro lugar, as citocinas apresentam meia vida biológica muito curta, o que impossibilita muitas vezes sua detecção no sangue, podendo inclusive fornecer resultados falso-negativos. Além disso, a avaliação “periférica” das citocinas não pode ser considerada evidência definitiva dos fenômenos imunológicos que

acontecem no aloenxerto, pois a produção *in situ* de citocinas pode não repercutir de forma sistêmica. Este fato deve ter ocorrido no presente estudo.

No presente estudo foi detectado aumento da expressão de NF κ B no aloenxerto vascular do grupo ALO em relação ao grupo ISO, indicando ativação desse fator de transcrição. O NF κ B pode ser encontrado em uma variedade de tipos celulares, incluindo células endoteliais e VSMC [Gareus et al., 2008], podendo ser ativado por estímulos pró-inflamatórios, tais como TNF- α , IL1- β e IL-6 [de Sá Lima et al., 2013; Vallabhapurapu, et al., 2009]. Na ausência de estímulos, os dímeros do NF κ B (p65, p50, p52, c-Rel e Rel B) encontram-se ligados a proteínas inibitórias I κ B, que mantém o complexo NF κ B no citoplasma. Na presença de determinados estímulos, a proteína I κ B é degradada pela fosforilação mediada pelo complexo I κ B quinase (IKK), constituído pelas subunidades IKK α e IKK β . As I κ B fosforiladas são responsáveis pela sinalização que liberam os dímeros de NF κ B para translocar para o núcleo da célula [Toby Lawrence, 2013].

A ativação do NF κ B nos animais do grupo ALO pode ser decorrente da ativação da resposta imune [Toby Lawrence, 2013]. Uma vez ativado, o NF κ B, como fator de transcrição, tem a propriedade de induzir a expressão de genes através da ligação em pequenas sequências de DNA, denominados sequência κ B que, por sua vez, estimulam a expressão de genes responsáveis pela síntese de citocinas [Hayden et al., 2004; Yamasaki et al., 2003; Toby Lawrence, 2013].

A diminuição da expressão do NFκB pela talidomida pode ser atribuída pela inibição direta da atividade do IKK. Keifer e cols demonstraram que células endoteliais em cultura respondem a diferentes estímulos culminando com ativação do NFκB por diferentes mecanismos de sinalização. Concluíram que a talidomida inibiu a ativação do NFκB pela inativação direta do complexo IκB quinase [Keifer et al., 2011]. Yagyu e cols mostraram efeitos semelhantes da talidomida em cultura de células endometriais estimuladas com TNF-α [Yagyu et al., 2005]. Por outro lado, as citocinas inflamatórias também podem promover a ativação do NFκB, em um processo de *feedback* positivo [Li et al., 2011]. Essas observações ampliam o conceito de que o bloqueio da produção de citocinas como TNF-α e IL1-β pode ser através da inibição do NFκB pela talidomida.

Em resumo, o presente estudo caracterizou os componentes celulares e moleculares envolvidos na vasculopatia crônica do transplante no modelo experimental de transplante de aorta. A análise da expressão dos mediadores inflamatórios e do NFκB realizadas no presente estudo, revelaram que estas moléculas são maciçamente produzidos *in situ*, refletindo um intenso quadro de ativação imunológica. A terapia com talidomida foi eficaz em proteger o aloenxerto vascular diminuindo a formação da camada neoíntima e a inflamação local. Além disso, diminuiu a expressão gênica e a concentração proteica de citocinas. Estes efeitos podem ser consequência da diminuição da expressão do NFκB induzido pela talidomida.

Os resultados do presente estudo sugerem que a talidomida possa representar uma futura estratégia terapêutica no manuseio e controle da resposta imune na vasculopatia do transplante.

6. RESUMO DOS RESULTADOS

- 1) O modelo experimental de vasculopatia do transplante foi padronizado com sucesso;
- 2) Não houve lesão vascular nos animais do grupo ISO, mantendo íntegra a arquitetura das camadas do aloenxerto vascular;
- 3) Os animais do grupo ALO desenvolveram vasculopatia crônica do transplante caracterizada por formação de neoíntima acompanhada por acentuado processo inflamatório em todas as camadas do aloenxerto de aorta;
- 4) No grupo ALO, foi detectado aumento na expressão de RNA mensageiro, além da concentração protéica dos mediadores inflamatórios TNF- α , IL1- β , IL-6, IFN- γ e IL-10 no aloenxerto de aorta. Além disso, também foi observado aumento na concentração sérica de TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-10;
- 5) Animais do grupo ALO apresentaram ativação do NF κ B, bem como o envolvimento dos dímeros p50 e p65;
- 6) O tratamento com talidomida foi eficaz em proteger o aloenxerto vascular através da redução da camada neoíntima e da inflamação local. Além disso, a talidomida induziu diminuição da expressão gênica e da concentração tecidual dos mediadores TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, INF- γ , bem como aumento da IL-4 e IL-10 no aloenxerto de aorta;
- 7) O terapia com talidomida diminuiu a ativação do NF κ B, provavelmente devido as suas propriedades e imunomoduladoras.

7. CONCLUSÕES

- 1) O modelo experimental de transplante de aorta foi padronizado com sucesso, e constitui um modelo adequado para o estudo da vasculopatia crônica do transplante, pois mimetiza as alterações vasculares durante o processo de rejeição crônica em humanos;
- 2) A talidomida teve um efeito vasculoprotetor no aloenxerto de aorta, provavelmente devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e imunomodulatórios;
- 3) A terapia com talidomida pode representar uma futura estratégia terapêutica no controle da resposta imune na vasculopatia do transplante.

8. REFERÊNCIAS

Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance. *Transplantation*. 2013;27(8):681-688.

Amirshahrokhi K. Anti-inflammatory effect of thalidomide in paraquat-induced pulmonary injury in mice. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(2):210-215.

Arai H, Furusu A, Nishino T, Obata Y, Nakazawa Y, Nakazawa M, Hirose M, Abe K, Koji T, Kohno S. Thalidomide prevents the progression of peritoneal fibrosis in mice. *Acta Histochem Cytochem*. 2011;44(2):51-60.

Bedi DS, Riella LV, Tullius SG, Chandraker A. Animal models of chronic allograft injury: contributions and limitations to understanding the mechanism of long-term graft dysfunction. *Transplantation*. 2010;90(9):935-944.

Belperio JA, Ardehali A. Chemokines and transplant vasculopathy. *Circ Res*. 2008;103(5):454-466.

Butler LM, Jeffery HC, Wheat RL, Long HM, Rae PC, Nash GB, Blackbourn DJ. *J Virol*. 2012;86(13):7158-7166.

Castier Y, Ramkhelawon B, Riou S, Tedgui A, Lehoux S. Role of NF-kappaB in flow-induced vascular remodeling. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(7):1641-1649.

Chen S, Kapturczak MH, Wasserfall C, Glushakova OY, Campbell-Thompson M, Deshane JS, Joseph R, Cruz PE, Hauswirth WW, Madsen KM, Croker BP, Berns KI, Atkinson MA, Flotte TR, Tisher CC, Agarwal A. Interleukin 10 attenuates neointimal proliferation and inflammation in aortic allografts by a heme oxygenase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(20):7251-7256.

Chong LW, Hsu YC, Chiu YT, Yang KC, Huang YT. Anti-fibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci*. 2006;13(3):403-418.

Clark TE, Edom N, Larson J, Lindsey LJ. Thalidomid® (Thalidomide) Capsules. A review of the first 18 months of spontaneous postmarketing adverse event surveillance, including off-label prescribing. *Drug Safety*. 2001;24(2):87-117.

Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:189-220.

- Dambrin C, Calise D, Pieraggi MT, Thiers JC, Thomsen M. Orthotopic aortic transplantation in mice: a new model of allograft arteriosclerosis. *J Heart Lung Transplant*. 1999;18(10):946-951.
- Davis R, Pillai S, Lawrence N, Sebti S, Chellappan SP. TNF- α -mediated proliferation of vascular smooth muscle cells involves Raf-1-mediated inactivation of Rb and transcription of E2F1-regulated genes. *Cell Cycle*. 2012;11(1):109-118.
- de Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(11):83-88.
- de Sá Lima L, Kawamoto EM, Munhoz CD, Kinoshita PF, Orellana AM, Curi R, Rossoni LV, Avellar MC, Scavone C. Ouabain activates NFkB through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. *Neuropharmacology*. 2013;73:327-336.
- Dutkowski P, de Rougemont O, Clavien PA. Alexis Carrel: genius, innovator and ideologist. *Am J Transplant*. 2008;8(10):1998-2003.
- el Khatib H, Lupinetti FM. Antigenicity of fresh and cryopreserved rat valve allografts. *Transplantation*. 1990;49(4):765-767.
- Fujita J, Mestre JR, Zeldis JB, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Thalidomide and its analogues inhibit lipopolysaccharide-mediated induction of cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res*. 2001;7(11):3349-3355.
- Gareus R, Kotsaki E, Xanthoulea S, van der Made I, Gijbels MJ, Kardakaris R, Polykratis A, Kollias G, de Winther MP, Pasparakis M. Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. *Cell Metab*. 2008;8(5):372-383.
- Gareus R, Kotsaki E, Xanthoulea S, van der Made I, Gijbels MJ, Kardakaris R, Polykratis A, Kollias G, de Winther MP, Pasparakis M. Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. *Cell Metab*. 2008;8(5):372-383.
- Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*. 2007;100(5):607-621.
- Hamar P, Lipták P, Heemann U, Iványi B. Ultrastructural analysis of the Fisher to Lewis rat model of chronic allograft nephropathy. *Transpl Int*. 2005;18(7):863-870.
- Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004;18(18):2195-2224.

Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107(11):1411-1122.

Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 2007;107(11):1411-1422.

Hillebrands JL, Rozing J. Chronic transplant dysfunction and transplant arteriosclerosis: new insights into underlying mechanisms. *Expert Rev Mol Med.* 2003;13;5(2):1-23.

Hruban RH, Long PP, Perlman EJ, Hutchins GM, Baumgartner WA, Baughman KL, Griffin CA. Fluorescence in situ hybridization for the Y-chromosome can be used to detect cells of recipient origin in allografted hearts following cardiac transplantation. *Am J Pathol.* 1993;(4):975-980.

Huang F, Gu J, Zhao W et al. One-year open-label trial of thalidomide in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2002;47:249-254.

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science.* 2010;327(5971):1345-1350.

Ji J, Xu F, Li L, Chen R, Wang J, Hu WC. Activation of adventitial fibroblasts in the early stage of the aortic transplant vasculopathy in rat. *Transplantation.* 2010;89(8):945-953.

Joudeh A, Saliba KA, Topping KA, Sis B. Pathologic basis of antibody-mediated organ transplant rejection: from pathogenesis to diagnosis. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013;18(4):478-485.

Jin X, Lu S, Xing X, Wang L, Mu D, He M, Huang H, Zeng X, Chen Q. Thalidomide: features and potential significance in oral precancerous conditions and oral cancer. *J Oral Pathol Med.* 2013;42(5):355-362.

Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Baldwin JrA. Inhibition of NF-kB activity by thalidomide through suppression of Ikb Kinase activity. *J Biol Chem.* 2001;276(25):22382-22387.

Khachigian LM, Fahmy RG, Zhang G, Bobryshev YV, Kaniaros A. c-Jun regulates vascular smooth muscle cell growth and neointima formation after arterial injury. Inhibition by a novel DNA enzyme targeting c-Jun. *J Biol Chem.* 2002;277(25):22985-22991.

Kim JH, Scialli AR. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol Sci.* 2011;122(1):1-6.

- Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):001651.
- Li Q, Liu BC, Lv LL, Ma KL, Zhang XL, Phillips AO. Monocytes induce proximal tubular epithelial-mesenchymal transition through NF-kappa B dependent upregulation of ICAM-1. *J Cell Biochem.* 2011;112(6):1585-1592.
- Li ZF, Fang XG, Yang PF, Huang QH, Zhao WY, Liang C, Zhao R, Liu JM. Endothelial progenitor cells contribute to neointima formation in rabbit elastase-induced aneurysm after flow diverter treatment. *CNS Neurosci Ther.* 2013;19(5):352-357.
- Majumdar S, Lamothe B, Aggarwal BB. Thalidomide suppresses NF-kB activation induced by TNF and H₂O₂, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. *J Immunol.* 2002;168(6):2644-2651.
- Majumder S, Sreedhara SR, Banerjee S, Chatterjee S. TNF- α signaling beholds thalidomide saga: a review of mechanistic role of TNF- α signaling under thalidomide. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(13):1456-1467.
- Mallavia B, Recio C, Oguiza A, Ortiz-Muñoz G, Lazaro I, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Schindler S, Depping R, Egido J, Gomez-Guerrero C. Peptide inhibitor of NF-kB translocation ameliorates experimental atherosclerosis. *Am J Pathol.* 2013;182(5):1910-1921.
- Marco ML. The Fischer-Lewis model of chronic allograft rejection-a summary. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(11):3082-3086.
- Mazighi M, Pellé A, Gonzalez W, Mtairag el M, Philippe M, Hénin D, Michel JB, Feldman LJ. IL-10 inhibits vascular smooth muscle cell activation in vitro and in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(2):H866-871.
- Mennander A, Tiisala S, Halttunen J, Yilmaz S, Paavonen T, Häyry P. Chronic rejection in rat aortic allografts. An experimental model for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb.* 1991;11(3):671-680.
- Min W, Pober JS. AIP1 in graft arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2011;21(8):229-233.
- Mitchell RN, Libby P. Vascular remodeling in transplant vasculopathy. *Circ Res.* 2007;100(7):967-978.
- Mitchell RN. Graft vascular disease: immune response meets the vessel wall. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:19-47.

- Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med*. 1993;177(6):1675-1680.
- Morgan GJ, Davies FE. Role of thalidomide in the treatment of patients with multiple myeloma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88 Suppl 1:S14-22.
- Mostefai HA, Bourget JM, Meziani F, Martinez MC, Leonetti D, Mercat A, Asfar P, Germain L, Andriantsitohaina R. Interleukin-10 controls the protective effects of circulating microparticles from patients with septic shock on tissue-engineered vascular media. *Clin Sci (Lond)*. 2013;125(2):77-85.
- Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, Sapolsky RM, Scavone C. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci*. 2006;5(14):3813-3820.
- Naemi FM, Carter V, Kirby JA, Ali S. Anti-Donor HLA Class I Antibodies: Pathways to Endothelial Cell Activation and Cell-Mediated Allograft Rejection. *Transplantation*. 2013;96(3):258-266.
- Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol*. 2011;12(8):695-708.
- Oliver SJ, Freeman SL, Corral LG, Ocampo CJ, Kaplan G. Thalidomide analogue CC1069 inhibits development of rat adjuvant arthritis. *Clin Exp Immunol*. 1999;118(2):315-321.
- Orth SR, Odoni G, Amann K, Strzelczyk P, Raschack M, Ritz E. The ET(A) receptor blocker LU 135252 prevents chronic transplant nephropathy in the "Fisher to Lewis" model. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(2):387-391.
- Park SJ, Kim HS, Yang HM, Park KW, Youn SW, Jeon SI, Kim DH, Koo BK, Chae IH, Choi DJ, Oh BH, Lee MM, Park YB. Thalidomide as a potent inhibitor of neointimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(5):885-891.
- Raje N, Anderson K. Thalidomide - A revival story. *N Engl J Med*. 1999;341(21):1606-1609.
- Religa P, Bojakowski K, Bojakowska M, Gaciong Z, Thyberg J, Hedin U. Allogenic immune response promotes the accumulation of host-derived smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2005; 65(2):535-545.

- Roberts N, Jahangiri M, Xu Q. Progenitor cells in vascular disease. *J Cell Mol Med*. 2005;9(3):583-591.
- Roux N, Brakenhielm E, Freguin-Bouillant C, Lallemand F, Henry JP, Boyer O, Thuillez C, Plissonnier D. Progenitor cell mobilizing treatments prevent experimental transplant arteriosclerosis. *J Surg Res*. 2012;176(2):657-665.
- Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn Z, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor α production by stimulated human monocytes. *J Exp Med*. 1991;173(3):699-703.
- Santana AC, Degaspari S, Catanozi S, Dellê H, de Sá Lima L, Silva C, Blanco P, Solez K, Scavone C, Noronha IL. Thalidomide suppresses inflammation in adenine-induced CKD with uraemia in mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(5):1140-1409.
- Santana AC, Marinotto DB, Dellê H, Cordeiro AC, Noronha IL. Effectiveness of thalidomide and tamoxifen in preventing neointimal hyperplasia in experimental vascular injury in rats. *Transplant Proc*. 2010;42(2):585-588.
- Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;(4):403-409.
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(5):878-888.
- Singhal S, Mehta J, Desikan R et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1999;18:1565-1571.
- Tabary O, Boncoeur E, de Martin R, Pepperkok R, Clément A, Schultz C, Jacquot J. Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Signal*. 2006;18(5):652-660.
- Taflin C, Charron D, Glotz D, Mooney N. Immunological function of the endothelial cell within the setting of organ transplantation. *Immunol Lett*. 2011;139(1-2):1-6.
- Tansey EM. Dark remedy: The impact of thalidomide and its revival as a vital medicine. *N Engl J Med*. 2001;345: 226-227.

Tellides G, Tereb DA, Kirkiles-Smith NC, Kim RW, Wilson JH, Schechner JS, Lorber MI, Pober JS. Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature*. 2000;403(6766):207-211.

Tramontana JM, Utaipat U, Molloy A, Akarasewi P, Burroughs M, Makonkawkeyoon S, Johnson B, Klausner JD, Rom W, Kaplan G. Thalidomide treatment reduces tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis. *Mol Med*. 1995;1(4):384-397.

Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:693-733.

Van der Harst JJ, Luijckx GJ. Treatment of central nervous system tuberculosis infections and neurological complications of tuberculosis treatment. *Curr Pharm Des*. 2011;17(27):2940-2947.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):45-65.

Walker SL, Waters MF, Lockwood DN. The role of thalidomide in the management of erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev*. 2007;78(3):197-215.

Wang Z, Newman WH. Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. *J Surg Res*. 2003;111(2):261-266.

White E, Hildemann WH, Mullen Y. Chronic kidney allograft reactions in rats. *Transplantation*. 1969;8(5):602-617.

Wohl DA, Aweeka FT, Schmitz J, Pomerantz R, Cherng DW, Spritzler J, Fox L, Simpson D, Bell D, Holohan MK, Thomas S, Robinson W, Kaplan G, Teppler H; National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group 267. Safety, tolerability, and pharmacokinetic effects of thalidomide in patients infected with human immunodeficiency virus: AIDS Clinical Trials Group 267. *J Infect Dis*. 2002;185(9):1359-1363.

Wollin M, Abele S, Bruns H, Weyand M, Kalden JR, Ensminger SM, Spriewald BM. Inhibition of TNF-alpha reduces transplant arteriosclerosis in a murine aortic transplant model. *Transpl Int*. 2009;22(3):342-349.

Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*. 2012;93(1):1-10.

Wu LF, Li GP, Su JD, Pu ZJ, Feng JL, Ye YQ, Wei BL. Involvement of NF-kappaB activation in the apoptosis induced by extracellular adenosine in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Biochem Cell Biol.* 2010;88(4):705-714.

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 1998;101(2):311-320.

Yacoub-Youssef H, Blaes N, Calise D, Thiers JC, Therville N, Benoist H, Ségui B, Al Saati T, Thomsen M. Interleukin-6 deficiency fails to prevent chronic rejection after aortic allografts in apolipoprotein E-deficient mice. *J Heart Lung Transplant.* 2009;28(1):85-92.

Yagyu T, Kobayashi H, Matsuzaki H, Wakahara K, Kondo T, Kurita N, Sekino H, Inagaki K, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 expression in endometriotic stromal cells, possibly through suppression of nuclear factor-kB activation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):3017-3021.

Yamasaki K, Asai T, Shimizu M, Aoki M, Hashiya N, Sakonjo H, Makino H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R. Inhibition of NFkappaB activation using cis-element 'decoy' of NFkappaB binding site reduces neointimal formation in porcine balloon-injured coronary artery model. *Gene Ther.* 2003;10(4):356-364.

Yu L, Qin L, Zhang H, He Y, Chen H, Pober JS, Tellides G, Min W. AIP1 prevents graft arteriosclerosis by inhibiting interferon- γ -dependent smooth muscle cell proliferation and intimal expansion. *Circ Res.* 2011;109(4):418-427.

Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF- α induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science.* 2009;325(5938):332-336.

Zheng Q, Liu S, Song Z. Mechanism of arterial remodeling in chronic allograft vasculopathy. *Front Med.* 2011;5(3):248-253.

Zhou X, Beck C, Boren J, Akyürek LM. Diverse origin of vascular smooth muscle cells in the neointima. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2005;5(3):216-220.