

**ALEXANDRE CHAGAS DE SANTANA**

**Estudo dos efeitos imunomoduladores da talidomida em  
modelo experimental de morte encefálica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Eberval Gadelha Figueiredo

Coorientador: Prof. Dr. Wellington Andraus

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.  
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo  
2021**

**ALEXANDRE CHAGAS DE SANTANA**

**Estudo dos efeitos imunomoduladores da talidomida em  
modelo experimental de morte encefálica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Eberval Gadelha Figueiredo

Coorientador: Prof. Dr. Wellington Andraus

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.  
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo  
2021**

**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  
Estudo dos efeitos imunomoduladores da  
talidomida em modelo experimental de morte  
encefálica / Alexandre Chagas de Santana. -- São  
Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Neurologia.

Orientador: Eberval Gadelha Figueiredo.

Coorientador: Wellington Andraus.

Descritores: 1.Morte encefálica 2.Transplante de  
órgãos 3.Talidomida 4.Inflamação 5.Citocinas 6.NF-kB

USP/FM/DBD-422/21

## DEDICATÓRIA

A **Jesus, o Cristo**, que é inteligência soberana e que tenho como mestre.  
Me deu forças para trilhar este caminho, muitas vezes árduo, mantendo  
sempre acesa minha fé!

“venham a mim, todos vocês que estão trabalhando duro e estão  
sobrecarregados, e eu os reanimarei. Tomem sobre vocês o meu jugo e  
aprendam de mim, pois sou de temperamento brando e humilde de  
coração, e acharão revigoramento para si mesmos. Pois meu jugo é suave  
e minha carga é leve”

Jesus, o Cristo  
(Mateus 11: 28-30)

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Ivone Chagas**, pelo amor, apoio e cumplicidade em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. **Eberval Gadelha Figueiredo**, meu orientador, agradeço por tudo que me foi ensinado. Sempre com uma postura ética e exemplar, incentivou e apoiou minha busca pelo aperfeiçoamento.

Ao Prof. **Wellington Andraus**, agradeço por todos ensinamentos, não apenas no campo das ciências, mas também no âmbito dos relacionamentos humanos.

Ao Prof. **Cristóforo Scavone**, pela intensa colaboração nos experimentos e nas discussões em torno deste trabalho.

Às Dras. **Karina Andrighetti**, **Natalia Nepomuceno** e **Liliane Ruiz**, pelo apoio e disponibilização do laboratório e dos materiais para a realização dos experimentos.

À equipe da OPO-HC FMUSP, **Edvaldo Leal**, **Leonardo Borges**, **Luís Pilan**, **Sônia Regina**, **Paulo Gradella**, **Eloisa Avelino**, **Fabrcio Neves**, **Ana Rúbia**, **Eduardo Rodrigo** e **Nair Cordeiro**, pelo constante incentivo.

Aos amigos **Filipe Miranda**, **Humberto Dellê** e **Rafael Pepineli**, pelo apoio em todas as horas.

Ao **Programa de Pós-graduação em Neurologia da FMUSP** pelo suporte.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviaturas dos títulos e periódicos de acordo com a *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

# SUMÁRIO

Lista de Símbolos

Lista de Siglas e Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1 Morte Encefálica .....	5
2.2 Aspectos Históricos e Diagnóstico da Morte Encefálica.....	6
2.3 Distúrbios Bioquímicos da Morte Encefálica .....	11
2.4 Manifestações Imunológicas da Morte Encefálica.....	15
2.5 Alterações Endócrinas da Morte Encefálica.....	21
2.6 Talidomida .....	23
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	30
3.1 Objetivo Primário .....	31
3.2 Objetivos Secundários .....	31
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
4.1 Modelo Experimental de Morte Encefálica.....	33
4.1.1 Animais.....	33
4.1.2 Indução da morte encefálica.....	34
4.1.3 Exame subsidiário: ultrassonografia transcraniana colorida.....	35
4.1.4 Tratamento farmacológico com talidomida.....	37
4.2 Desenho do estudo.....	38
4.2.1 Grupos experimentais .....	38
4.2.2 Descarte dos animais.....	39
4.3 Determinações Bioquímicas.....	39
4.4 Imuno-histoquímica.....	39
4.4.1 Coleta e processamento do tecido.....	39
4.4.2 Corte dos fragmentos do tecido.....	40
4.4.3 Desparafinização .....	40
4.4.4 Identificação de macrófagos M1 .....	41
4.4.5 Análise das lâminas .....	43

4.5 Expressão Gênica.....	43
4.5.1 Extração de RNA total.....	43
4.5.2 Quantificação do RNA total.....	44
4.5.3 Síntese de cDNA .....	44
4.5.4 PCR em Tempo Real: qPCR .....	45
4.6 Análise de Citocinas por Multiplex/Luminex.....	46
4.7 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética para o NFκB.....	47
4.7.1 Extração de proteínas nucleares do tecido.....	48
4.7.2 Marcação da sonda.....	48
4.7.3 Reação de ligação e corrida do gel.....	49
4.7.4 Ensaios de Super-Shift.....	50
4.8 Análise Estatística.....	50
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1 Análise de Pressão Arterial Média (PAM) .....	52
5.2 Análise das Concentrações Plasmáticas de AST, ALT, LDH e FA.....	53
5.3 Imuno-histoquímica para Macrófagos M1.....	53
5.4 Análise dos Mediadores Inflamatórios no Tecido Hepático.....	55
5.5 Detecção de MHC de Classe I e MHC de Classe II.....	58
5.6 Concentração Plasmática dos Mediadores Inflamatórios .....	59
5.7 Análise da Expressão e da Atividade do NFκB.....	60
5.8 Análise das subunidades p50, p65 e c-Rel .....	63
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>



## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>%</b>	porcentagem
<b>=</b>	igual
<b>x</b>	vezes
<b>±</b>	mais ou menos
<b>°C</b>	graus centígrados
<b>µm</b>	micrômetro
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	cálcio
<b>cm<sup>2</sup></b>	centímetro quadrado
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>dL</b>	decilitro
<b>g</b>	grama
<b>h</b>	hora
<b>K<sup>+</sup></b>	potássio
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>kg</b>	kilograma
<b>L</b>	litro
<b>m</b>	mili
<b>M</b>	molar
<b>mg</b>	miligrama
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>mm</b>	milímetro
<b>mmHg</b>	milímetros de mercúrio
<b>µm</b>	micrômetro
<b>Na<sup>+</sup></b>	sódio
<b>p</b>	coeficiente de significância estatística
<b>PaCO<sub>2</sub></b>	pressão parcial de dióxido de carbono
<b>pH</b>	potencial de hidrogeniônico
<b>rpm</b>	rotação por minuto
<b>vs</b>	<i>versus</i>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ACTH</b>	Hormônio Adrenocorticotrófico
<b>ADH</b>	Hormônio Antidiurético
<b>ADMA</b>	<i>Dimetil Arginina Assimétrica</i>
<b>ANN</b>	<i>American Academy of Neurology</i>
<b>APC</b>	<i>Antigen Presenting Cells</i> (células apresentadoras de antígenos)
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>AVEI</b>	Acidente Vascular Encefálico Isquêmico
<b>BHE</b>	Barreira Hematoencefálica
<b>BH<sub>2</sub></b>	Diidrobiopterina
<b>BH<sub>4</sub></b>	Tetraidrobiopterina
<b>COVID-19</b>	<i>Corona Virus Disease-19</i>
<b>CXCL12/SDF-1</b>	<i>CXC Motif Chemokine 12 / Stromal Cell-Derived Factor 1</i>
<b>CCL2/MCP-1</b>	CC Motif Ligand 2 / Monocyte Chemoattractant Protein
<b>CXCL14/BRAK</b>	<i>CXC Motif Chemokine 14 / Breast and Kidney Expressed Chemokine</i>
<b>CCL20</b>	<i>CC Motif Chemokine Ligand 20</i>
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CD4</b>	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
<b>CD8</b>	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
<b>CFM</b>	Conselho Federal de Medicina
<b>CT</b>	<i>Threshold Cycle</i>
<b>CRBN</b>	<i>Cereblon</i>
<b>CUL4A</b>	<i>Cullin 4A</i>
<b>CUL4B</b>	<i>Cullin 4A</i>
<b>DDB1</b>	<i>Damaged DNA Binding Protein 1</i>
<b>DTC</b>	Doppler Transcraniano
<b>DMSO</b>	<i>Dimetilsulfóxido</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>E3</b>	Ubiquitina-Ligase
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
<b>EEG</b>	Eletroencefalograma

<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FGF8</b>	Fator de Crescimento de Fibroblastos 8
<b>GH</b>	Hormônio de Crescimento Humano
<b>GTPc</b>	Monofosfato de Guanosina Cíclico
<b>HCL</b>	Ácido Clorídrico
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator Induzível por Hipóxia - 1 $\alpha$
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (antígeno leucocitário humano)
<b>HSA</b>	Hemorragia Subaracnoidea
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inibidor kappa
<b>KHz</b>	Kilohertz
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 Beta
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>LCR</b>	Líquido Cerebroespinal
<b>ME</b>	Morte Encefálica
<b>MHC</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>MMP-9</b>	Metaloproteinase-9
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucleico Mensageiro
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear Factor Kappa B</i> (fator nuclear kappa B)
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>NMDA</b>	<i>N-metil-D-aspartato</i>
<b>eNOS</b>	Endotelial Óxido Nítrico Sintase
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase Induzida
<b>nNOS</b>	Neuronal Óxido Nítrico Sintase
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NOS</b>	Óxido Nítrico Sintase
<b>PAS</b>	Pressão Arterial Sistólica
<b>p50</b>	Subunidade p50
<b>p65</b>	Subunidade p65
<b>PBS</b>	Solução Salina Fosfato-Tamponada

<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ROC1</b>	<i>Regulator of Cullins 1</i>
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SPECT</b>	Tomografia Computadorizada de Emissão de Fóton Único
<b>T4</b>	Tiroxina
<b>T3</b>	Triiodotironina
<b>TBS</b>	Solução Salina Tris-Tamponada
<b>TCE</b>	Traumatismo Crânio Encefálico
<b>TCR</b>	<i>T-Cell Antigen Receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor-alfa</i>
<b>TLRs</b>	<i>Toll Like Receptors</i>
<b>TSH</b>	Hormônio Estimulador da Tireoide
<b>VAS-203</b>	Ronopterina
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática das principais alterações durante o processo da morte encefálica.....	20
<b>Figura 2.</b> Representação ilustrativa dos enantiômeros da talidomida .....	24
<b>Figura 3.</b> Imagens ilustrativas dos efeitos teratogênicos da talidomida .....	25
<b>Figura 4.</b> Representação ilustrativa da fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$ e da translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo celular .....	28
<b>Figura 5.</b> Análise do fluxo sanguíneo cerebral identificado por ultrassonografia transcraniana colorida.....	37
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do protocolo experimental .....	38
<b>Figura 7.</b> Análise comparativa da evolução da PAM entre os grupos experimentais.....	52
<b>Figura 8.</b> Imuno-histoquímica para detecção de macrófagos M1 no tecido hepático .....	54
<b>Figura 9.</b> Quantificação do infiltrado de macrófagos M1 no tecido hepático nos diferentes grupos experimentais .....	54
<b>Figura 10.</b> Análise comparativa da expressão gênica e da concentração dos mediadores inflamatórios no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais.....	57
<b>Figura 11.</b> Análise comparativa da expressão gênica de MHC de Classe I e MHC de Classe II no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais .....	59
<b>Figura 12.</b> Análise comparativa da expressão gênica do NF- $\kappa$ B no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais.....	61
<b>Figura 13.</b> Ensaios de <i>Gel-Shift</i> para NF- $\kappa$ B no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais .....	62
<b>Figura 14.</b> Análise da quantificação densiométrica da banda de NF- $\kappa$ B no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais .....	63
<b>Figura 15.</b> Imagem ilustrativa do ensaio de <i>Super-Shift</i> para p50, p65 e c-Rel no tecido hepático após a indução da morte encefálica .....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência dos <i>primers</i> ( <i>forward e reverse</i> ) utilizados nas reações de PCR em tempo real .....	46
<b>Tabela 2.</b> Análise comparativa das enzimas indicadoras de lesão hepática entre os diferentes grupos experimentais .....	53
<b>Tabela 3.</b> Análise comparativa dos mediadores inflamatórios no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais.....	56
<b>Tabela 4.</b> Análise comparativa da expressão de MHC de Classe I e MHC de Classe II no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais .....	59
<b>Tabela 5.</b> Análise comparativa dos mediadores inflamatórios no plasma entre os diferentes grupos experimentais .....	60

## RESUMO

Santana AC. *Estudo dos efeitos imunomoduladores da talidomida em modelo experimental de morte encefálica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Nos últimos 50 anos, o transplante de fígado tem evoluído rapidamente, despontando como terapia definitiva para a insuficiência hepática em estágio terminal. A grande maioria dos fígados usados para transplantes são obtidos de doadores com diagnóstico de morte encefálica (ME). A ME é caracterizada por uma resposta inflamatória generalizada que resulta em deterioração dos órgãos periféricos. Esse processo é mediado principalmente por citocinas, que amplificam a imunogenicidade do enxerto. Nesse contexto, investigamos a resposta imunológica em um modelo de ME e analisamos os efeitos da talidomida, uma droga com propriedades imunomoduladoras. A ME foi induzida em ratos Lewis machos. Foram estudados 3 grupos: **Controle** (animais sham-operados); **ME** (animais submetidos à ME através do aumento da pressão intracraniana); **ME + Talidomida** (animais submetidos a ME tratados com talidomida). 6 horas após a ME, analisamos a PAM, os níveis plasmáticos das enzimas AST, ALT, LDH, ALP, além da expressão de mediadores da resposta imune (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) no tecido hepático e na circulação sistêmica. Além disso, determinamos a expressão gênica de MHC Classe I e MHC Classe II, bem como o infiltrado de macrófagos no fígado. Ensaio de *Gel-Shift* e *Super-Shift* também foram realizados para avaliar a atividade do NF- $\kappa$ B e o envolvimento das subunidades p50, p65 e c-Rel no tecido hepático. As propriedades imunomoduladoras da talidomida foram eficazes em reduzir as citocinas pró-inflamatórias (local e plasmática), além do infiltrado de macrófagos, levando a uma melhora da lesão hepática, determinada pela redução das enzimas circulantes. Os efeitos da talidomida ocorreram, possivelmente, por meio da supressão da ativação do NF- $\kappa$ B. Tomado em conjunto, esses resultados apresentam fortes evidências que os efeitos imunomoduladores da talidomida parecem prevenir o aumento da imunogenicidade no tecido hepático durante a ME, um processo aparentemente mediado pela atividade do NF- $\kappa$ B. Ademais, esses achados fornecem importantes *insights* para a utilização da talidomida como droga imunossupressora e, talvez, como um alvo para futuras terapias direcionadas para melhorar a imunogenicidade do enxerto e, conseqüentemente, no impacto potencial da sobrevida do órgão transplantado.

Descritores: Morte encefálica; Transplante de órgãos; Talidomida; Inflamação; Citocinas; NF- $\kappa$ B.

## ABSTRACT

Santana AC. *The immunomodulatory effects of thalidomide in the experimental model of brain death* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Over the past 50 years, liver transplantation has advanced dramatically and is considered the definitive therapy for end-stage liver failure. A vast majority of the livers used for transplantation are obtained from brain-dead donors. Brain death (BD) is characterized by a generalized inflammatory response that results in multiorgan damage. This process is mainly mediated through cytokines, which amplify the graft immunogenicity. Thus, we investigated the immunological response in a brain death liver donor model and analyzed the effects of thalidomide, a drug with powerful immunomodulatory properties. BD was induced in male Lewis rats. We studied three groups: **Control** (sham-operated rats), **BD** (rats subjected to brain death by increasing intracranial pressure) and **BD + Thalidomide** (BD rats receiving thalidomide after brain death). 6 hours after BD, serum levels of AST, ALT, LDH, and ALP as well as systemic and hepatic levels of TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, and IL-10 were analysed. We also determined the mRNA expression of MHC Class I and Class II, NF- $\kappa$ B, and macrophage infiltration. NF- $\kappa$ B was also examined by *Gel-Shift*, and p50, p65 and c-Rel subunits by *Super-Shift*. The immunomodulatory properties of thalidomide were effective in decreasing systemic and local pro-inflammatory cytokines, as well as inflammatory cell infiltration, leading to an improvement of liver damage as reflected in decreased hepatic enzymes levels. Furthermore, the immunomodulatory effects of thalidomide possibly were through suppression of NF- $\kappa$ B activation. In addition, these data show evidence of potent immunomodulatory effects of thalidomide that appear to prevent increased immunogenicity. Taken together, these data provide key insights into the understanding of the immune response in brain dead organ donor, as well as to the potential use of thalidomide as a immunosuppressant and, perhaps, as a target for future therapies directed towards ameliorate the graft immunogenicity, and beneficial effect in outcome after transplantation.

Descriptors: Brain death; Organ transplantation; Thalidomide; Inflammation; Cytokines; NF- $\kappa$ B.



# 1 INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

O tratamento para diversas condições clínicas caracterizadas pelo comprometimento morfológico e funcional grave e irreversível de órgãos ou tecidos teve um avanço significativo na segunda metade do século XX, com o advento do transplante de órgãos, um dos grandes marcos na história da medicina [Barker *et al.*, 2013].

No entanto, os avanços no aprimoramento dessa modalidade de tratamento esbarram em uma série de dificuldades, que vão desde a escassez de órgãos para transplante até a natureza agressiva dos procedimentos cirúrgicos e a dependência crônica de drogas imunossupressoras, responsáveis por uma ampla gama de efeitos adversos [Pratschke *et al.*, 2001].

Atualmente, a grande totalidade dos órgãos disponíveis para transplante são procedentes de doadores com diagnóstico de morte encefálica, cujos impactos negativos na sobrevida do enxerto transplantado, vem sendo cada vez mais confirmados na literatura [Floerchinger *et al.*, 2012; Danobeitia, 2012]. De fato, estudos mostram que a morte encefálica é intrinsecamente capaz de induzir diversas alterações sistêmicas, resultando em instabilidade hemodinâmica, alterações hormonais, hipotermia, distúrbios bioquímicos e metabólicos, além de resposta inflamatória intensa generalizada [Van der Hoeven *et al.*, 2001]. Consequentemente, tais alterações contribuem para a deterioração progressiva da função dos órgãos acometendo a viabilidade do enxerto no período pós-transplante [Van der Hoeven *et al.*, 2001].

Apesar dos avanços alcançados no entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da morte encefálica, a compreensão dos mecanismos imunológicos, nesta circunstância, ainda exerce um papel patogênico importante, comprometendo a eficácia desta modalidade terapêutica [Floerchinger *et al.*, 2012]. Portanto, admite-se que a morte encefálica é considerada um importante fator de risco para o transplante de órgãos.

Devido à inexistência de alternativas terapêuticas específicas para o controle da resposta imunológica durante a morte encefálica, a utilização de terapias de imunomodulação é de extrema importância [Bugge, 2009]. Nesse contexto, talidomida, uma droga com potentes propriedades imunomodulatórias, representa uma promissora estratégia terapêutica sobre a resposta imunológica em doadores de órgãos com diagnóstico de morte encefálica [Smith, 2004; Majumdar *et al.*, 2002].

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Morte Encefálica

A notável influência exercida pelo documento denominado “Relatório de Harvard”, publicado em 1968, alterou a experiência humana sobre a redefinição de morte [Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School, 1968]. Tal pressuposto filosófico entrelaça questões científicas neurofisiológicas com a hermenêutica do significado da vida humana, ou seja, é implícito estudar morte encefálica por referência a doação e transplante de órgãos.

Há poucos anos, a morte encefálica começou a ser mais bem entendida, tanto com estudos clínicos como experimentais [Pratschke *et al.*, 2001]. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na patogênese da morte encefálica são semelhantes, independente da agressão neurológica. Os efeitos prejudiciais da oxigenação inadequada resultam em alterações bioquímicas e imunológicas secundárias, as quais levam a formação de edema, aumento da pressão intracraniana e, conseqüentemente, interrupção generalizada do fluxo sanguíneo e necrose do tecido cerebral [Van der Hoeven *et al.*, 2001].

Atualmente, o valor prognóstico da morte encefálica vem sendo reconhecido. De fato, diversos estudos mostraram que a morte encefálica induz deterioração estrutural e funcional dos órgãos de potenciais doadores, constituindo uma importante complicação no período pós-transplante [Martins *et al.*, 2006]. Portanto, o estudo desses mecanismos envolvidos na morte

encefálica, pode representar um importante avanço no entendimento do impacto da morte encefálica no doador de órgãos.

## 2.2 Aspectos Históricos e Diagnóstico da Morte Encefálica

O diagnóstico de morte encefálica tem evoluído ao longo do tempo. Em 1959 os neurologistas franceses Mollaret e Goulon, após avaliarem 23 pacientes em coma, publicaram o *The dépassed coma: preliminary memoir (coma dépassée)* [Mollaret *et al.*, 1959]. O *coma dépassée* ou “estado de coma irreversível” ou, literalmente, “coma ultrapassado” foi descrito como um estado de coma irreversível, sem reflexos com comprometimentos da consciência após lesão cerebral [Mollaret *et al.*, 1959].

Ademais, caracterizava-se pela imobilidade do globo ocular, midríase parálitica, ausência de deglutição, ausência de resposta motora, ausência de respiração espontânea, descontrole da temperatura corporal e eletroencefalograma isoeletrico [Mollaret *et al.*, 1959]. Mollaret e Goulon usando a expressão *coma dépassée*, idealizavam descrever as condições dos pacientes que, devido às terapias de reanimação, ainda continuavam a vida, embora destinados a morrer em breve.

Em dezembro de 1967, com a realização do primeiro transplante cardíaco na África do Sul, pelo cirurgião Christian Barnard, a comunidade científica observou a necessidade de elaborar critérios mais específicos para determinação do coma irreversível e, conseqüentemente, quais pacientes poderiam ser elegíveis para doação de órgãos [Brink *et al.*, 2009].

Nesse contexto, é importante salientar que Mollaret and Goulon mencionavam várias questões sobre dilemas éticos: *“Temos o direito de interromper a ressuscitação usando critérios que tentam definir os limites da vida e da morte?”*, *“O suporte de vida deve ser mantido enquanto há batimentos cardíacos e perfusão dos órgãos vitais?”*. *“E as questões religiosas?”*. Goulon também argumentava que o *“coma dépassée”* é uma condição perturbadora para o observador, que o levava a questionar: *“onde mora a alma do paciente?”* [Goulon et al., 1971].

Ao discutir o fenômeno da morte cerebral, em 1968 a Faculdade de Medicina de Harvard, organizou um comitê *“Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School”* composto por 11 profissionais de diferentes áreas (7 médicos, 1 jurista, 1 biólogo, 1 sociólogo e 1 historiador) que definiram os critérios que conceituaram o estado de coma irreversível [Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School, 1968].

Um novo documento foi elaborado, equiparando a morte cerebral do organismo à condição que os franceses haviam chamado de *“coma dépassée”* e, portanto, pela primeira vez era indicada com a expressão *“irreversible coma”*, ou seja, a mesma condição clínica que antes indicava um prognóstico infausto, agora passava a ser diagnóstico de morte com rigorosos critérios clínicos.

*“Nosso principal objetivo é definir como um novo critério de morte e coma irreversível. Impõe-se a necessidade de uma definição por motivos: 1) o aperfeiçoamento das medidas de reanimação e de prolongamento da vida*

*produziu um compromisso sempre maior para salvar pessoas atingidas por lesões desesperadamente graves. Às vezes esses esforços têm um êxito somente parcial e aquilo que temos a nossa frente é um indivíduo cujo coração continua batendo, embora com um cérebro irremediavelmente prejudicado. O peso dessa situação é enorme, não somente para os pacientes, mas também para as respectivas famílias, para os hospitais e todos aqueles que estão necessitando de leitos já ocupados por esses pacientes em coma; 2) os critérios de morte, obsoletos, podem desencadear controvérsias na procura de órgãos para os transplantes” [Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School, 1968, tradução nossa]. Assim, nascia a nova definição de morte, que iria, com o tempo, substituir a tradicional morte definida por meio parada cardiorrespiratória.*

Em 1976 no Reino Unido, durante a *Conference of Royal College of Medicine*, as associações médicas discutiram sobre os critérios de morte de tronco encefálico, mediante documentos que estabeleciam rigorosos diagnósticos visando o desligamento do ventilador mecânico, na certeza que o paciente com lesão irrecuperável de tronco encefálico, não teria chances de recuperação [De Georgia, 2014]. Consequentemente, definiu-se que a morte do tronco encefálico significaria a morte do paciente, independentemente do prognóstico cardíaco.

Atualmente, a definição de morte encefálica está intimamente ancorada nas diretrizes estabelecidas pela *American Academy of Neurology* (AAN). O diagnóstico é baseado em uma abrangente avaliação clínica neurológica com ausência de reflexos do tronco cerebral e apnéia. É imprescindível que o



paciente tenha lesão encefálica de causa conhecida e irreversível, exames de imagem que justifiquem a causa do coma, ausência de distúrbios hidroeletrólíticos, ácido-básicos, endocrinológicos e de intoxicação exógena, hipotermia (temperatura central  $>36^{\circ}\text{C}$ ), ausência de movimentos respiratórios espontâneos e de fármacos com ação depressora do sistema nervoso central (SNC), além de PAS  $\geq 100\text{mmHg}$ . Vale mencionar, contudo, que a AAN exclui a obrigatoriedade da realização de exame complementar em todos os pacientes [Shewmon *et al.*, 2011].

Estas avaliações podem estar acompanhadas de exame complementar que demonstre, de forma inequívoca, a ausência de circulação sanguínea intracraniana ou atividade elétrica cerebral, ou atividade metabólica cerebral. Os principais exames complementares utilizados são: doppler transcraniano (DTC), angiografia cerebral, eletroencefalograma (EEG), cintilografia e SPECT cerebral. Ademais, para a escolha do exame complementar os aspectos clínicos também devem ser considerados [Shewmon *et al.*, 2011; Wijdicks *et al.*, 2010].

No Brasil, de acordo com a lei nº 9.434 de 04 de fevereiro de 1997, que dispõe sobre a retirada de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento, determina em seu artigo 3º que compete ao Conselho Federal de Medicina (CFM) definir os critérios para diagnóstico de ME. Assim, a Resolução nº 2.173, de 23 de novembro de 2017, define os critérios do diagnóstico de ME [Resolução nº 1.480/97 do CFM, 1997]. Basicamente, a resolução do CFM segue as mesmas diretrizes definidas pela

AAN. A principal diferença é que no Brasil a realização do exame complementar é obrigatória.

Dessa maneira, a resolução do CFM define que a morte encefálica será caracterizada através da realização de exames clínicos e complementares durante intervalos de tempos variáveis, específicos para determinadas faixas etárias.

Os intervalos mínimos entre as duas avaliações clínicas necessárias para a caracterização de morte encefálica foi definido por faixa etária. Além disso, os testes clínicos são realizados para avaliar as características do coma não perceptivo e a ausência de reflexos do tronco cerebral. Deve-se observar o estado de inconsciência permanente, com ausência de resposta motora supraespinhal a qualquer estímulo. Além disso, avaliam-se os reflexos fotomotor, córneo-palpebral, oculocefálico, vestibulo-calórico e de tosse [Resolução nº 1.480/97 do CFM, 1997].

A realização da prova de apnéia é obrigatória para determinar o diagnóstico de morte encefálica. Define-se apnéia pela ausência de movimentos respiratórios espontâneos, após estímulo máximo do centro respiratório. Para tanto, o paciente deve possuir uma oxigenação satisfatória (acima de 94%) e pressão parcial de PaCO<sub>2</sub> entre 35 e 45 mmHg. A ausência de drive respiratório é avaliada por meio da retenção de CO<sub>2</sub> [Resolução nº 1.480/97 do CFM, 1997].

No contexto mundial, todos os países exigem a realização dos testes neurológicos que determinem ausência de reflexos do tronco encefálico. No

entanto, os países diferem sobre os critérios legais para iniciar e determinar o diagnóstico de morte encefálica. Na Argentina, México e Holanda, o exame complementar também é obrigatório, enquanto em outros, como Alemanha, Dinamarca, Portugal e Rússia, o exame complementar é opcional [Dosemeci *et al.*, 2004]. Em países como Bélgica, Noruega, Suíça, Finlândia e Holanda, o exame clínico para o diagnóstico de morte encefálica é realizado apenas uma vez.

Em virtude do diagnóstico de morte encefálica, as indicações para transplante de órgãos estão se tornando cada vez mais eficazes, levando a uma expansão no número de potenciais doadores de órgãos, contribuindo na melhora e perspectiva do tempo, bem como na qualidade de vida de pacientes doenças em estágio avançado.

### **2.3 Distúrbios Bioquímicos da Morte Encefálica**

Os efeitos prejudiciais da morte encefálica resultam em uma cascata complexa de eventos, culminando em vários distúrbios bioquímicos em todas as células do SNC, as quais levam à perda neuronal e a lesão axonal difusa, bem como alterações morfológicas com o comprometimento funcional das células da glia [Floerchinger *et al.*, 2012; Bramlett *et al.*, 2004; Pratschke *et al.*, 2005].

As alterações bioquímicas encefálicas (primárias e/ou secundárias) envolvem vários aspectos, tais como o excesso de excitação (L-glutamato e L-aspartato) por meio dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) em células

neuronal. Essa excitação altera a permeabilidade da membrana celular induzindo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ , bem como ativação da calcineurina e calmodulina. Estes mecanismos, por sua vez, modulam várias atividades biológicas, caracterizadas por neurodegeneração, excitotoxicidade, hipóxia, atividade pró-inflamatória, disfunção mitocondrial e ativação do óxido nítrico (NO) [Syntichaki *et al.*, 2003; Faden *et al.*, 1989; Rothman *et al.*, 1986].

Caracteristicamente, a excitotoxicidade induz despolarização da membrana mitocondrial, podendo desencadear aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, levar as células à morte por apoptose [Chen *et al.*, 2017]. Além disso, o  $\text{K}^+$  é liberado do meio intracelular e absorvido pelos astrócitos circunjacentes, na tentativa de restringir o desequilíbrio iônico, induzindo edema celular e destruição axonal [Hoane *et al.*, 2000].

O NO, por sua vez, influencia a lesão encefálica por diferentes formas, dependendo do local, mecanismo de indução, síntese e concentração. A molécula de NO é um gás radical livre (pois apresenta um elétron desemparelhado na órbita externa), altamente instável e com grande ação vasodilatadora. É sintetizado por enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) a partir do substrato L-arginina [Chen *et al.*, 2017].

As NOS são representadas por três isoformas, as quais desempenham diferentes níveis de controle nas diferentes funções exercidas pelo NO: a isoforma identificada nos corpos celulares neuronais do SNC (nNOS), a identificada em células endoteliais e no plexo coroide (eNOS) e a identificada

em macrófagos, células da glia, além de células tumorais em resposta a citocinas inflamatórias (iNOS) [Garry *et al.*, 2015].

O NO é livremente difusível e atravessa as membranas celulares, podendo atuar na transmissão sináptica, na plasticidade neuronal, na regulação do fluxo sanguíneo do SNC, na amplificação da resposta inflamatória, bem como na formação da memória e transmissão de sinais de dor [Garry *et al.*, 2015; Charriaut-Marlangue *et al.*, 2013].

No encéfalo os efeitos do NO podem ser classificados em neuroprotetores, neurotóxicos e deletérios, dependendo da etiologia do insulto encefálico (isquêmica, traumática ou hemorrágica) e da isoforma precursora na sua síntese. De fato, estudos em modelos experimentais de acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI) mostraram que as isoformas iNOS e nNOS induzem efeitos neurotóxicos e deletérios, enquanto as eNOS exerceram efeitos neuroprotetores [Iadecola, 1997].

Por outro lado, evidências revelaram que os mecanismos de ativação das eNOS também estão relacionados com lesão neuronal difusa [Srivastava *et al.*, 2012]. De fato, o desacoplamento funcional das eNOS do seu cofator tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) ocorre após insulto cerebral isquêmico. As eNOS desacopladas, contribuem para a formação de superóxidos ao invés de NO.

Os superóxidos, por sua vez, reagem com o NO dando origem ao ânion peroxinitrito. O peroxinitrito oxida a BH<sub>4</sub> ao subproduto inativo diidrobiopterina (BH<sub>2</sub>), de modo que a relação BH<sub>2</sub>/BH<sub>4</sub> é um indicador relevante da síntese de NO bioativo pela eNOS. Portanto, uma vez formado, o peroxinitrito (molécula

altamente reativa) causa lesões oxidativas no SNC devido suas ações neurotóxicas [Garry *et al.*, 2015].

Concomitantemente, tal condição priva o microambiente da bioatividade do NO, comprometendo o metabolismo aeróbio dos neurônios, acentuando e lesão cerebral secundária [Garry *et al.*, 2015]. Além disso, a depleção de NO tem sido associada ao aumento dos níveis de P-selectina que, por sua vez, estimula a formação de trombos, amplificando a hipóxia e a disfunção neurofisiológica global [Garry *et al.*, 2015]. Os mecanismos dessa aparente dualidade das eNOS são complexos e não estão elucidados até o momento, mas podem envolver processos específicos associados com o mecanismo de indução e o tempo do insulto isquêmico encefálico.

Outra via que ainda pode contribuir na patogênese da morte encefálica é o NO proveniente das iNOS após traumatismo crânio encefálico (TCE). Estudos revelaram que a expressão das iNOS é significativamente induzida, atingido picos de concentração entre 1-2 dias após o trauma [Wada *et al.*, 1998]. Em paralelo, foi relatado que a expressão das iNOS relaciona-se com ativação das micróglia, levando a toxicidade de neurônios e oligodendrócitos, evento essencial na patogênese da morte encefálica. Ademais, análises mais recentes sustentam a importância das iNOS na regulação do processo neuroinflamatório nos estágios agudos do TCE [Clark *et al.*, 1996].

Fortalecendo essas observações, um estudo clínico conduzido em pacientes com trauma encefálico, usando ronopterin (VAS-203), um inibidor de NOS que age preferencialmente nas iNOS, mostrou melhora neurológica significativa com base na escala de glasgow [Stover *et al.*, 2014].

Outros estudos também indicam que a expressão e/ou atividade da eNOS está intimamente relacionado ao vasoespasma cerebral, após hemorragia subaracnoidea (HSA). De fato, o vasoespasma promove diminuição dos níveis de monofosfato de guanosina cíclico (GTPc) e nitritos no líquido cerebrospinal (LCR). Sob essas condições, o endotélio sofre disfunção, culminando em diminuição dos níveis de NO ao redor da parede vascular [Chen *et al.*, 2017].

Além disso, a dimetil arginina assimétrica (ADMA) é um exemplo bem conhecido que pode levar a redução funcional das eNOS, não apenas por induzir a produção de radicais superóxidos, mas também por interferir na clivagem oxidativa da bilirrubina no LCR hemorrágico [Chen *et al.*, 2017; Cooke, 2000]. A formação da ADMA é favorecida em condições de estresse oxidativo [Cooke, 2000].

Boa parte da complexidade dos distúrbios bioquímicos na morte encefálica pode ser atribuída aos efeitos do NO, constituindo-se, nessa condição, um importante alvo de intervenções terapêuticas.

#### **2.4 Manifestações Imunológicas da Morte Encefálica**

Outro fator que deve ser levado em consideração está relacionado com a resposta imunológica, observada na gênese e progressão da morte encefálica. Independente da etiologia do insulto neurológico, a fase secundária caracteriza-se por um intenso processo neuroinflamatório. Esse processo envolve a ativação da micróglia e dos astrócitos, além da liberação de mediadores inflamatórios no cérebro e recrutamento de células imunes

periféricas [Xiong *et al.*, 2018]. A micróglia e os astrócitos são ativados por diversos mecanismos, especialmente por espécies reativas de oxigênio. Conseqüentemente, a ativação dessas células resulta na produção de mediadores imunológicos que amplificam a resposta inflamatória local, impedindo a recuperação das funções neurológicas [Lakhan, *et al.*, 2009].

A micróglia constitui a primeira linha de defesa no cérebro, sendo capaz de sintetizar e liberar citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, bem como moléculas potencialmente citotóxicas, incluindo prostaglandinas e NO [Watts *et al.*, 2013]. A micróglia e os astrócitos também produzem espécies reativas de oxigênio, culminando em neurodegeneração [Wang *et al.*, 2014]. É evidente, portanto, que as vias de sinalização do estresse oxidativo e da resposta inflamatória, possuem mecanismos bidirecionais.

Outro aspecto importante são as complicações vasculares decorrentes da disfunção endotelial. De fato, o endotélio como interface entre as moléculas circulantes e os tecidos apresenta a barreira primordial de proteção, contra qualquer insulto neurológico [Watts *et al.*, 2013]. Além disso, diversas funções são atribuídas ao endotélio, entre elas a manutenção do tônus vascular, a inibição da agregação plaquetária, o controle de adesão de moléculas, além da síntese e liberação de citocinas inflamatórias [Watts *et al.*, 2013].

Em circunstâncias de neuroinflamação, sob efeitos do TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , o endotélio passa ao estado ativado, apresentando a habilidade de rapidamente sintetizar e liberar diferentes moléculas de adesão: E-selectina, P-selectina, ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e VCAM-1 (molécula de adesão



vascular celular) [Zhong *et al.*, 2018]. Além disso, as células endoteliais também produzem TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, favorecendo o recrutamento de leucócitos na parede do vaso, com consequente amplificação do processo inflamatório [Watts *et al.*, 2013].

A célula endotelial também tem sido implicada na resposta imunológica, como célula profissional apresentadora de antígenos, tanto por moléculas HLA de Classe I, como por moléculas HLA de Classe II [Rothermel *et al.*, 2004]. Além destes efeitos, diversas linhas de investigação demonstraram que a resposta neuroinflamatória influencia na integridade e função da barreira hematoencefálica (BHE).

Constituída pelos astrócitos, pericitos, micróglia, neurônios, matriz extracelular e endotélio, a BHE atua como interface dinâmica entre o SNC e a circulação periférica, controlando o influxo/efluxo de substratos essenciais nos processos neurofisiológicos [Takata *et al.*, 2011; Shlosberg *et al.*, 2010]. De fato, observações mostraram que neurônios e células da glia expressam diversos receptores de quimiocinas, como CXCL14/BRAK, CXCL12/SDF-1, CCL2/MCP-1 e CCL20 em condições patológicas [Das *et al.*, 2011; Schmid *et al.* 2009; Jong *et al.*, 2005]. Higashida e colaboradores também demonstraram que o processo neuroinflamatório induziu a expressão de HIF-1 $\alpha$  (fator induzível por hipóxia - 1 $\alpha$ ) e MMP-9 (metaloproteinase-9), levando a ruptura da lâmina basal e degradação das junções oclusivas da BHE [Higashida *et al.*, 2011].

Estudos *in vitro* demonstraram que o TNF- $\alpha$  desempenha um papel essencial na ativação dos pericitos, e liberação de MMP-9 de seus estoques intracelulares, aumentando a permeabilidade do endotélio [Takata *et al.*, 2011]. Outros estudos sustentam a participação da IL-6 no rompimento da integridade das células endoteliais, diminuindo a resistência elétrica transendotelial alterando a permeabilidade da BHE [Erickson *et al.*, 2018].

É importante mencionar que, na vigência do processo inflamatório, a micróglia produz espécies reativas de oxigênio e, uma vez produzidas, podem causar danos oxidativos nas junções oclusivas, além da ativação das metaloproteinases, resultando em alterações estruturais e funcionais da BHE [Pun *et al.*, 2009]. Portanto, a manutenção da BHE envolve uma complexa comunicação das atividades bioquímicas e imunológicas.

Nesse processo, uma importante via de sinalização intracelular associada a imunidade é o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (do inglês: nuclear factor *kappa* B). Esse fator corresponde a um grupo de proteínas (expresso em quase todos os tipos de células) que atua como fator de transcrição regulando uma grande variedade de genes, particularmente no contexto imunológico.

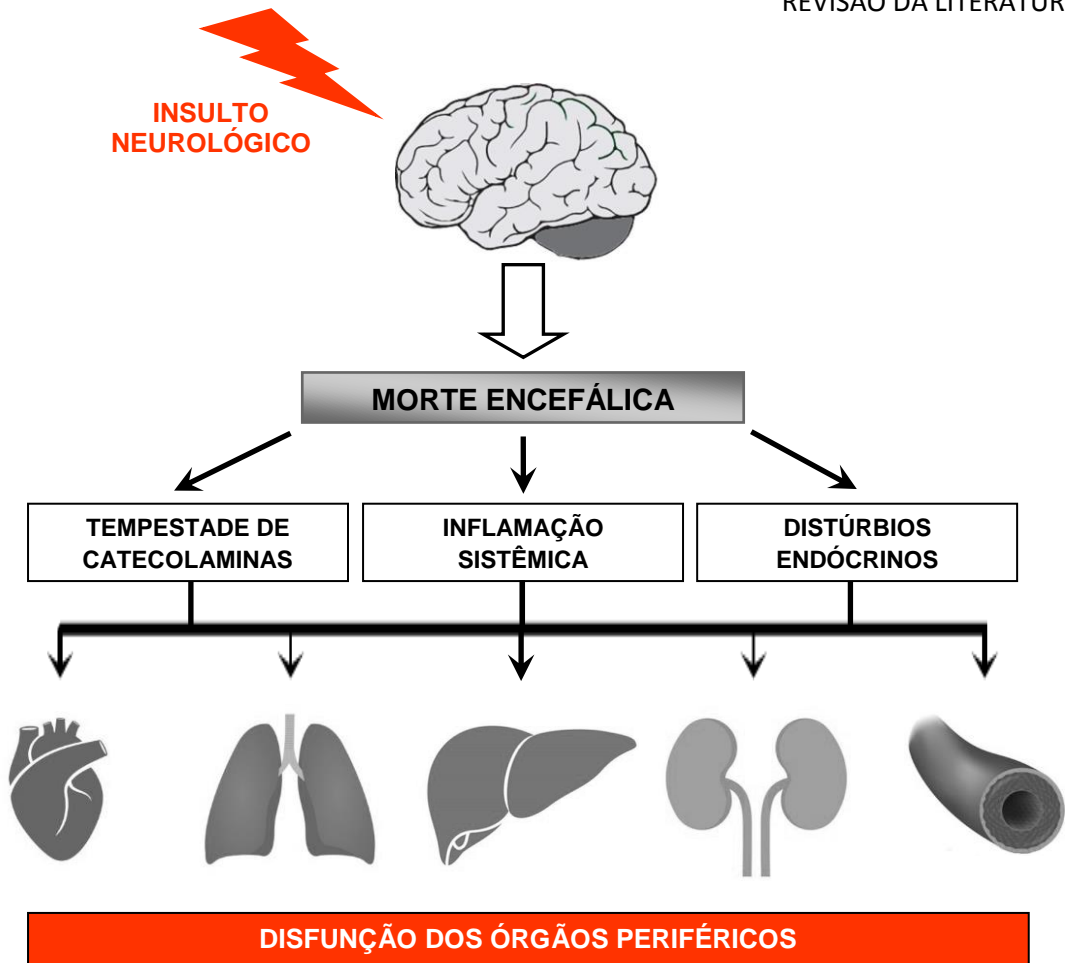
O NF- $\kappa$ B pode ser ativado por interleucinas, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , bem como por espécies reativas de oxigênio e NO, que aumentam a sensibilização dos receptores relacionados à inflamação decorrente da exposição dos *toll like receptors* (TLRs), que ativa o NF- $\kappa$ B e provoca redução na atividade da Na/K ATPase, além de alterações na sinalização mediada pelo Ca<sup>++</sup>, destacando seu papel dual no SNC [You *et al.*, 2013; Lawrence, 2009].

Uma descoberta importante é que o endotélio, por meio do estímulo da produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , promove aumento da E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 via aumento da expressão do NF- $\kappa$ B, contribuindo com o estado inflamatório exacerbado [Zhong *et al.*, 2018].

Um trabalho clássico evidenciou que a resposta imune induz a expressão de moléculas MHC nas células endoteliais, via ativação do NF- $\kappa$ B, processo considerado chave na rejeição de órgãos [Israel *et al.*, 1989].

Além disso, dois estudos mais recentes, conduzidos em modelo experimental de morte encefálica, mostraram paralelamente aumento da expressão de NF- $\kappa$ B e MHC Classe II, e sugeriram fortemente que a morte encefálica pode induzir imunogenicidade em órgãos periféricos [Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008].

De fato, a expressão dessas moléculas representa a principal interface do enxerto com as células do sistema imune do receptor, condição fundamental do desencadeamento do processo de rejeição [Cozzi *et al.*, 2017]. Os mecanismos envolvidos durante a morte encefálica representam, portanto, um importante fator de risco para o transplante de órgãos.



**Figura 1.** Representação esquemática das principais alterações durante o processo de morte encefálica. Em suma, após o insulto neurológico, independente da natureza etiológica, é desencadeada; **(A)** Intensa liberação de catecolaminas. Tal condição induz vasoconstrição, culminando em hipertensão arterial e arritmia cardíaca, além de isquemia e necrose do miocárdio. Após a descarga de catecolaminas, segue-se um período de extrema vasodilatação (hipotensão arterial) e instabilidade hemodinâmica; **(B)** Inflamação sistêmica, caracterizada pelo aumento de mediadores inflamatórios, levando a disfunção endotelial (expressão de ICAM e VCAM), bem como aumento na expressão de moléculas MHC Classe I e Classe II, ou seja, aumento da alogenicidade de praticamente todos os órgãos periféricos; **(C)** Há diminuição inexorável do ADH e da insulina, acarretando em diabetes *insipidus* e hiperglicemia. Além disso, há diminuição de T3 livre e de cortisol, alterando o metabolismo e levando a instabilidade hemodinâmica.

Clinicamente, a interferência da inflamação sistêmica na integridade da BHE é observada no surgimento das alterações de comportamento, delírio e encefalopatia séptica [Vratharaj *et al.*, 2017]. Adicionalmente, há relatos da redução ou perda da função da BHE devido a alterações sistêmicas, como o aumento da temperatura corporal [Kiyatkin *et al.*, 2009], atividade física intensa [Watson *et al.*, 2005], diferentes tipos de estresse [Esposito *et al.*, 2001] e algumas drogas psicotrópicas como a morfina [Sharma., 2006].

## **2.5 Alterações Endócrinas da Morte Encefálica**

As alterações endócrinas observadas na morte encefálica decorrem da falência progressiva e inexorável do eixo hipotálamo-hipófise, condição normalmente associada a insulto isquêmico grave, hérnia de tronco encefálica e hipertensão intracraniana [Youn *et al.*, 2014].

A manifestação típica e imediata é a diminuição precoce do hormônio antidiurético (ADH) e, conseqüentemente, desenvolvimento de diabetes *insipidus*. De fato, evidências clínicas mostram que aproximadamente 80% dos pacientes com diagnóstico de morte encefálica apresentam níveis indetectáveis de ADH circulante. Tal condição, por sua vez, resulta em diurese aumentada (com defeitos na concentração urinária) e comprometimento da estabilidade hemodinâmica, além de distúrbios eletrolíticos, especialmente hipernatremia e hipocalemia [Bugge, 2009].

A falência do eixo hipotálamo-hipófise, também compromete a síntese e liberação dos hormônios da tireoide, levando a diminuição rápida e

progressiva de T4 e T3 circulantes, bem como diminuição do TSH [Ranasinghe *et al.*, 2011; Bugge, 2009]. Interessantemente, outras evidências sugerem que os níveis séricos de TSH permanecem normais, condição característica da síndrome do paciente eutireoideo (níveis séricos de T4 - T3 e T4 reduzidos ou próximos do limite, porém, com níveis de TSH normais).

Além disso, estudos experimentais e clínicos sugerem que níveis diminuídos de T3 estão relacionados com deterioração das atividades funcionais cardíacas. Estudos conduzidos em suínos demonstraram que concentrações diminuídas de T3 alteram a natureza energética do miocárdio, convertendo o metabolismo aeróbico para anaeróbico [Novitzky *et al.*, 2006; Novitzky, *et al.*, 1987].

A concentração plasmática de cortisol encontra-se relativamente diminuída na maioria dos doadores em morte encefálica. No entanto, a capacidade de aumentar a secreção de cortisol, por meio da estimulação com hormônio ACTH, não parece ser afetada. O exato mecanismo fisiopatológico dessas alterações ainda permanece desconhecido [Dimopoulou *et al.*, 2003]. É digno de nota, ressaltar que alguns centros utilizam terapia com corticoide em doadores de órgãos, justificada por sua conhecida propriedade anti-inflamatória, não sendo relacionada à insuficiência adrenal.

É importante mencionar, que a função da hipófise anterior parece estar bem preservada na maioria dos doadores com valores normais ACTH, TSH, e GH, indicando alguma função residual, devido perfusão do eixo hipotálamo-hipófise preservada, o que explica função normal da hipófise em alguns pacientes com diagnóstico de morte encefálica.

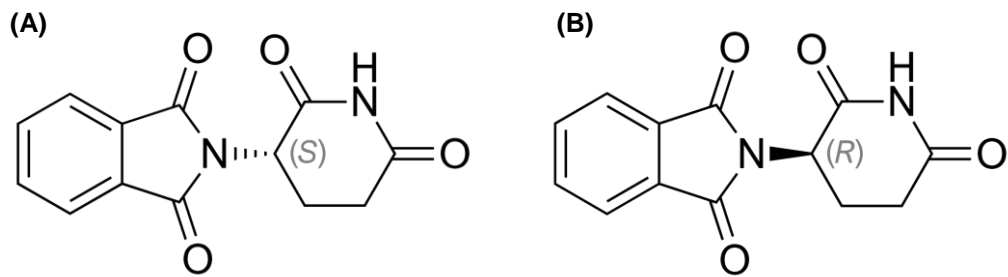
Diminuições bruscas nos níveis plasmáticos de insulina são constatadas imediatamente após a morte encefálica, levando aumento da concentração extracelular de glicose e mudança para o metabolismo anaeróbico, contribuindo importantemente para a acidose, com consequente hipoperfusão tecidual dos órgãos [Nair-Collins *et al.*, 2014; Bugge, 2009; Smith, 2004].

## 2.6 Talidomida

Um dos capítulos mais sombrios que circundou a história da medicina moderna começou em 1953, quando a talidomida foi sintetizada na Suíça pela *CIBA Pharmaceutical Company* e, posteriormente, na então Alemanha Ocidental pela indústria farmacêutica *Chemie Grünenthal* [Franks *et al.*, 2004; Rajkumar, 2004].

A talidomida é um derivado do ácido glutâmico, seu nome químico é [(±)2-(2,6-dioxo-3-piperidinil)-1H-isoindol-1,3-(2H)-diona ou (±)-ftalimidoglutarimida (1)] com peso molecular 258,23 g/mol. É um pó branco, insípido, cristalino com ponto de fusão de 271°C.

Estruturalmente a droga contém dois anéis amida e um único centro quiral, caracterizados por dois isômeros (enantiômeros) opticamente ativos: levogiro (-)(S) e dextrogiro (+)(R), que se interconvertem rapidamente em condições fisiológicas. Várias evidências têm demonstrado que o enantiômero dextrogiro está associado com propriedades sedativas, enquanto o enantiômero levogiro é responsável pelos efeitos teratogênicos e imunomoduladores que a droga possui [Mori *et al.*, 2018] (**Figura 2**).



**Figura 2.** Representação ilustrativa dos enantiômeros da talidomida. **(A)** levogiro: (-)(S)-talidomida; **(B)** dextrogiro: (+)(R)-talidomida.

A talidomida chegou ao mercado em 1956, sendo amplamente comercializada como sedativo não barbitúrico e antiemético durante a gestação em mais de 40 países, incluindo Alemanha, Suécia, Japão, Canadá, Inglaterra e Brasil [Rajkumar, 2004].

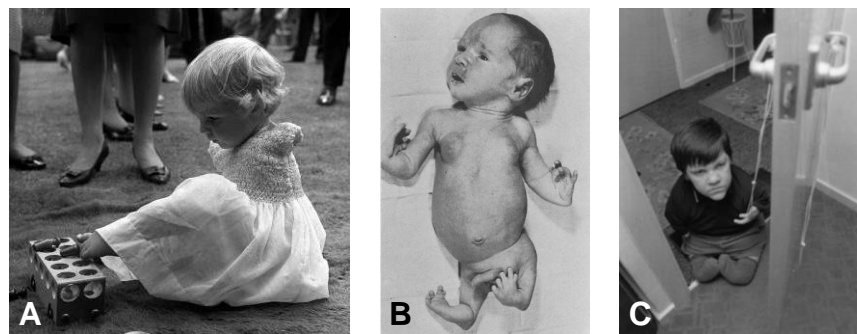
Na Alemanha, a talidomida foi anunciada como uma droga segura e absolutamente atóxica, podendo ser adquirida sem a necessidade de prescrição médica. Em 1958, no Reino Unido, a talidomida foi produzida pela *The Distillers Company (Biochemicals) Ltd.* e comercializada com o nome de Distaval. Seu anúncio afirmava que o medicamento poderia ser administrado com total segurança em gestantes e lactantes, sem efeitos adversos na mãe ou na criança. No Brasil, por sua vez, a talidomida foi comercializada por diversos laboratórios com diferentes nomes (Sedalis, Sedin e Slip), todos indicados como sedativo-hipnótico não barbitúrico, cuja substância era destituída de efeitos secundários e bem tolerada por crianças e portadores de lesões hepáticas [Leandro et al., 2015].

Contudo, no início dos anos 60, ficou evidente que o uso da talidomida durante o período gestacional estava associado com graves efeitos



teratogênicos, tais como amelia (ausência completa de braços e/ou pernas), focomelia (aproximação ou encurtamento dos membros junto ao tronco do feto), além de fissura labial e deformidades de órgãos internos [Matthews *et al.*, 2003]. Estudos mostraram que os efeitos teratogênicos da talidomida são desencadeados quando a droga é ingerida durante a gestação, especialmente entre os dias 35 e 49, após o último período menstrual. Os estudos também mostraram que uma única pílula é suficiente para induzir os efeitos teratogênicos. Ademais, aproximadamente 40% das crianças afetadas morrem no primeiro ano de vida [Rajkumar, 2004].

Em 1962, após contínuos relatos de anomalias congênicas, a droga foi retirada do comércio mundial [Tansey *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2001]. Em termos mercadológicos, vale ressaltar que o *Food and Drug Administration* (FDA) não autorizou o uso da talidomida nos EUA, devido a evidências de neuropatia e alterações da tireoide como efeitos adversos.



**Figura 3.** Imagens ilustrativas dos efeitos teratogênicos da talidomida. Fonte: **(A)** *The Guardian*, 2014. **(B)** *N Engl J Med*, 1964. **(C)** *CNN World*, 2012.

Em 1965, Jacob Sheshkin relatou pela primeira vez a eficácia da utilização da talidomida no tratamento de pacientes com eritema nodoso hansênico (forma

lepromatosa do mal de hansen) [Sheshkin 1965]. A partir de então, a Organização Mundial da Saúde (OMS) coordenou diversos ensaios clínicos sobre o uso da talidomida para o tratamento do eritema nodoso hansênico, sob rígido controle e precauções [World Health Organization, 1977]. Nesse contexto, Hellman e colaboradores, usando um modelo experimental de transplante de pele, demonstraram que a talidomida possui efeitos imunomodulatórios, aumentando a sobrevivência de tecidos transplantados [Hellman *et al.*, 1965].

Atualmente, o uso clínico da talidomida como terapia imunomoduladora foi expandido para outras doenças: mieloma múltiplo, manifestações cutâneas do eritema nodoso hansênico, tuberculose, síndrome da imunodeficiência adquirida, doença de Crohn, entre outras doenças [Chen *et al.*, 2019; Fourcade *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2005; Franks *et al.*, 2004]. Estudos mais recentes também sugerem um efeito imunomodulador da talidomida em pacientes diagnosticados com COVID-19 [Chen *et al.*, 2021; Khali *et al.*, 2020].

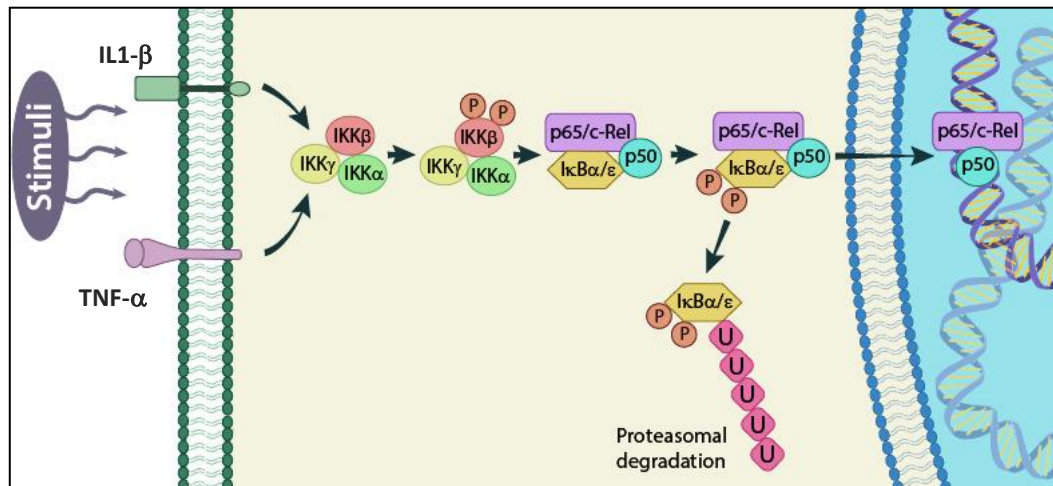
Além das evidências clínicas da talidomida, diversos estudos experimentais ampliaram o conceito sobre as propriedades imunomodulatórias e anti-inflamatórias da talidomida, bloqueando, particularmente, citocinas Th1 [Santana *et al.*, 2013]. De fato, estudos *in vitro* tem mostrado que a talidomida é um potente inibidor da expressão de TNF- $\alpha$  sintetizado por células tumorais, monócitos e macrófagos [Vallet *et al.*, 2008; Sampaio *et al.*,

1993; Moreira *et al.*, 1991]. Outros estudos também mostraram os efeitos da talidomida no bloqueio das citocinas IL1- $\beta$  e IL-6 [Zhu *et al.*, 2014].

Estas respostas são orquestradas, em partes, pelo NF- $\kappa$ B. O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição constituído de duas subunidades proteicas: p50 e p65. É considerado uma das mais importantes vias de sinalização intracelular da resposta imunológica, especialmente quando induzido pelo TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ . Ademais, o NF- $\kappa$ B integra uma família de fatores de transcrição redox-sensíveis presentes nas células endoteliais, macrófagos e linfócitos [Gareus *et al.*, 2008].

Vários fatores, além do estresse oxidativo, ativam o NF- $\kappa$ B como, o excesso de cálcio, citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  [Tabary *et al.*, 2006]. Uma vez ativado, o NF- $\kappa$ B induz a ativação de genes responsáveis pela síntese de citocinas pró-inflamatórias [Lawrence *et al.*, 2009]. Além disso, a ativação do NF- $\kappa$ B induz genes de atividade pro-apoptótica [Luedde *et al.*, 2011].

Nesse contexto, diversos estudos têm demonstrado o papel da talidomida como potente modulador da expressão do NF- $\kappa$ B em diferentes tipos celulares [Majumdar *et al.*, 2002; Keifer *et al.*, 2001]. Outros estudos apontam que a ativação do NF- $\kappa$ B está associada com a expressão de moléculas MHC, mostrando um papel essencial do NF- $\kappa$ B no contexto de um transplante alogênico [Molinero *et al.*, 2004] **(Figura 4)**.



**Figura 4.** Representação ilustrativa: TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzem a fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$  e, conseqüente, translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo celular. Adaptado de Philipp Jost e Jürgen Ruland - *Blood*, 2007.

Após 5 décadas de estudos sobre os mecanismos teratogênicos da talidomida, em 2010 Ito e colaboradores, analisando embriões de *zebrafish* e aves, demonstraram que a talidomida liga-se diretamente na *cereblon* (CRBN), uma proteína de 443 aminoácidos, com ações em diversos processos biológicos, tais como transporte de íons, metabolismo celular, proliferação celular e apoptose [Shi *et al.*, 2017]. A CRBN forma um complexo E3 ubiquitina-ligase que contém DDB1 (*damaged DNA binding protein 1*), CUL4A (*cullin 4A*) ou CUL4B (*cullin 4B*) e ROC1 (*regulator of cullins 1*), essencial para o desenvolvimento morfológico dos membros e controle da expressão do fator de crescimento de fibroblastos 8 (FGF8) [Ito *et al.*, 2010].

A ligação da talidomida com a CRBN inibe as atividades do complexo E3. Conseqüentemente, há acúmulo de vários substratos que desencadeia

múltiplos defeitos no desenvolvimento dos membros no feto e, em partes, atua como regulador negativo na expressão de FGF8 [Ito *et al.*, 2010].

Apesar dos importantes achados científicos citados acima, ainda não há um estudo que mostre os efeitos da talidomida sobre os fenômenos imunológicos durante a morte encefálica.

## 3 OBJETIVOS

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Primário

Analisar e caracterizar os efeitos da talidomida sobre a resposta imunológica no modelo experimental de morte encefálica.

#### 3.2 Objetivos Secundários

- 1) Investigar a participação local e sistêmica de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 através da expressão gênica (PCR em tempo real) e da concentração proteica (Multiplex), bem como a quantificação de macrófagos por imuno-histoquímica no fígado;
- 2) Analisar e caracterizar a atividade do NF- $\kappa$ B no tecido hepático por *Gel-Shift* e *Super-Shift*;
- 3) Analisar a alogenicidade no fígado por meio da análise dos níveis de mRNA de MHC Classe I e MHC Classe II;
- 4) Analisar parâmetros da bioquímica hepática por meio da determinação dos níveis plasmáticos de AST, ALT, LDH e FA.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Toda metodologia aplicada no presente estudo foi desenvolvida em concordância com os padrões nacionais e internacionais de cuidados e uso de animais de laboratório, com aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA - nº 131/17) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

### 4.1 Modelo Experimental de Morte Encefálica

#### 4.1.1 Animais

O modelo animal utilizado no presente estudo consistiu em linhagens isogênicas de ratos Lewis (LEW - RT1<sup>1</sup>). Esta linhagem foi obtida a partir do acasalamento entre irmãos, por 20 ou mais gerações consecutivas, resultando em características fenotípicas únicas e igualdade genética. O estudo foi conduzido em sua totalidade com ratos machos, de modo a evitar variabilidade genética relacionada ao gênero.

Todos os animais foram obtidos de uma colônia, dessa linhagem de ratos, estabelecidas no biotério local do Laboratório de Transplante de Fígado da FMUSP. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente de 23±1°C e ciclo claro/escuro 12/12h.

No presente estudo, foram estudados 24 ratos Lewis machos, pesando entre 300 e 400g, devidamente assistidos com monitoração ventilatória e hemodinâmica.

O modelo experimental de morte encefálica utilizado nesse estudo consiste na indução do aumento da pressão intracraniana (PIC) com auxílio de um cateter de Fogarty®. Esse modelo mimetiza de forma robusta as alterações encontradas em pacientes com diagnóstico de morte encefálica, tornando-se ferramenta fundamental para o estudo da patogênese *in vivo*, bem como para testar e desenvolver novas estratégias terapêuticas dirigidas tanto no doador, quanto no receptor de órgãos.

#### 4.1.2 Indução da morte encefálica

Os animais foram inicialmente pesados e então submetidos ao protocolo de morte encefálica descrito por Kolkert e colaboradores [Kolkert *et al.*, 2007]. Após a indução anestésica através de isoflurano (*Forane*®, Abbott SA, Buenos Aires; 5%) em câmara fechada, os animais foram submetidos à intubação orotraqueal com cateter de polietileno nº 06. Em seguida, foram ventilados usando um ventilador pulmonar mecânico microcontrolado para pequenos animais (*Harvard 683, Harvard Apparatus, Inc, Holliston, MA, USA*) com os seguintes parâmetros ventilatórios:  $FiO_2 = 100\%$ , volume corrente: 10mL/Kg e frequência de 70 ciclos por minuto. Os animais foram colocados em plataforma cirúrgica com aquecimento controlado (37°C), em decúbito ventral, após assepsia da região cervical e do crânio com álcool iodado a 2%. A artéria carótida direita foi canulada, utilizando-se para isso cateter de polietileno Clay Adams PE-10. O cateter, então, foi conectado a um transdutor de pressão (P23XL Viggo-Spectramed Statham, CA, USA) acoplado no monitor (DIXTAL, DX 2021, Brasil) para registro da Pressão Arterial Media (PAM) durante o todo o período experimental.

Em seguida, uma broca motorizada foi utilizada para perfuração da calota craniana (trepanação) e inserção intracraniana de um cateter do tipo Fogarty-4F (*Edwards Lifescience LLC, Irvine, CA, USA*). A efetiva indução da morte encefálica ocorreu por meio da rápida insuflação do cateter com 500  $\mu$ L de salina, sendo confirmada pelos seguintes parâmetros: pico hipertensivo, ausência de reflexo palpebral, midríase bilateral e apnéia. Após a indução da morte encefálica a anestesia foi suspensa e os animais permaneceram ventilados por um período de 6 horas. Os animais controles, por sua vez, também foram submetidos a trepanação, sem que houvesse a inserção do cateter do tipo Fogarty-4F (sham-operados).

#### 4.1.3 Exame subsidiário: ultrassonografia transcraniana colorida

As avaliações da ultrassonografia transcraniana colorida foram realizadas com a unidade de *Ultrassom Micromaxx (Sonosite, EUA)* em conjunto com um transdutor linear de 6 a 14 MHz. Após indução anestésica dos animais, a artéria carótida interna esquerda foi canulada para monitoramento invasivo da PA. Os valores de PA sistólicas foram monitorados com o objetivo permanecer  $\geq 90$  mmHg e, caso necessário, infusão de solução salina a 0,9% para correção dos parâmetros hemodinâmicos. O gel de condução para ultrassom foi aplicado para melhorar a condutividade.

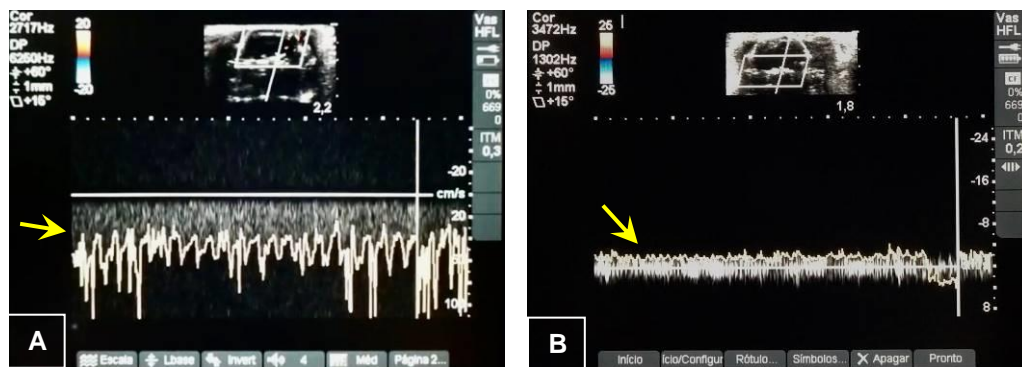
Inicialmente, a ultrassonografia 2-D foi usada para visualizar uma imagem transversal em modo B do crânio, bem como as estruturas cerebrais dos animais. O ultrassom doppler colorido foi então usado e as artérias extra e intracranianas foram indicadas na tela por duas cores diferentes (azul e vermelho), em que a cor azul indica fluxo sanguíneo distante do transdutor e a

cor vermelha indica o fluxo em direção ao transdutor. A sonda foi colocada acima do crânio e a varredura transversal foi realizada movendo a sonda com delicados movimentos de trás para frente.

A profundidade da imagem foi fixada em 2 cm ao aplicar a magnificação. Algumas configurações foram padronizadas, também para ultrassom doppler colorido, tais como frequência de ultrassom em 6,3 MHz, frequência de repetição pulsada a 4 kHz, além da taxa de quadros de 65 quadros/s. Uma lâmpada de aquecimento foi usada para manter a temperatura corporal estável a fim de evitar hipotermia.

Após a tricotomia, o primeiro exame visualizou a artéria carótida interna direita, artéria cerebral média direita, além da artéria basilar. A artéria carótida interna esquerda e a artéria carótida comum esquerda não foram observadas/avaliadas devido à canulação. O espectro doppler foi obtido em todos os vasos mencionados acima **(Figura 5A)**.

Após a insuflação do Fogarty-4F, o segundo exame foi realizado e monitorado até nenhum sinal vascular intracraniano ser obtido, mesmo reduzindo a frequência de repetição pulsada ao menor valor alcançável. Picos sistólicos abaixo de 10 cm/s foram recuperados na artéria carótida interna direita e artéria basilar, ao nível da base do crânio, compatíveis com colapso circulatório encefálico **(Figura 5B)**.



**Figura 5.** Análise do fluxo sanguíneo cerebral identificado por ultrassonografia transcraniana colorida. **(A)** Presença de fluxo sanguíneo na direção reversa (seta) antes da morte encefálica. **(B)** Presença de fluxo compatível com colapso circulatório encefálico (seta).

Após a confirmação da morte encefálica, foi realizada coleta de sangue através artéria carótida direita, com auxílio de uma seringa de 3 mL. Imediatamente após a coleta de sangue, foi realizada uma laparotomia longitudinal mediana de aproximadamente 6 cm, seguida de abertura da cavidade abdominal com exposição do fígado. Em seguida, o fígado foi cuidadosamente pinçado com auxílio de uma pinça anatômica, e pequenos fragmentos de tecido hepático foram cuidadosamente removidos e preparados para as diferentes análises.

#### 4.1.4 Tratamento farmacológico com talidomida

Os animais receberam tratamento farmacológico com talidomida (*Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brasil*) na dose de 200mg/Kg dissolvido em solução fisiológica estéril contendo 10% de DMSO e administrado por gavagem [Zhang *et al.*, 2018; Chong *et al.*, 2006].

## 4.2 Desenho do Estudo

### 4.2.1 Grupos experimentais

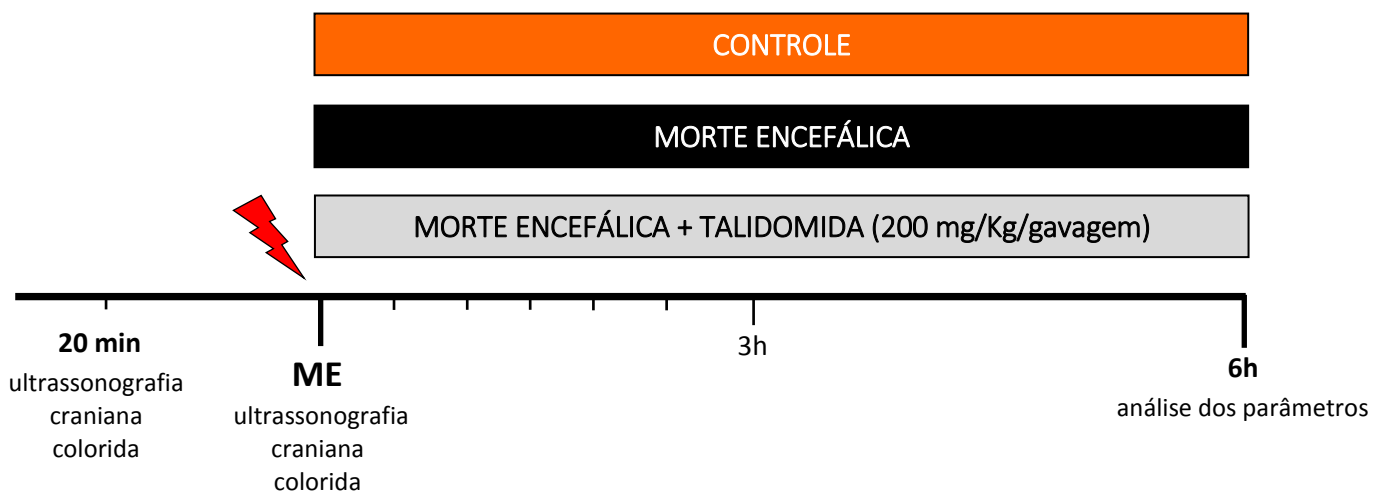
O estudo foi desenvolvido com 3 grupos experimentais assim constituídos:

**CONTROLE:** Animais submetidos à trepanação sem a inserção do cateter de Fogarty (sham-operados) (n=8).

**ME:** Animais submetidos a morte encefálica através do aumento da PIC por cateter de Fogarty (n=8).

**ME + TALIDOMIDA:** Animais submetidos a morte encefálica tratados com talidomida (n=8).

O organograma ilustrativo referente ao desenho experimental do estudo está representado na **Figura 6**.



**Figura 6.** Representação esquemática do protocolo experimental.

#### 4.2.2 Descarte dos animais

Após o protocolo experimental, os animais foram acondicionados em sacos plásticos brancos leitosos, com o logotipo “Risco Biológico”, identificados com etiquetas que constam a origem e o conteúdo, bem como o responsável. Em seguida, os animais foram colocados em um carro (específico para animais), e transportados até o reservatório de coleta hospitalar destinada à incineração.

### **4.3 Determinações Bioquímicas**

As amostras de sangue foram coletas pela carótida esquerda com auxílio de uma seringa de 3 mL. As concentrações plasmáticas das transaminases AST e ALT, além das enzimas LDH e FA, foram avaliadas como indicadores de anormalidades do fígado. A quantificação dos resultados foi realizada pelo método ultravioleta otimizado (*COBAS MIRA, Roche*) de acordo com protocolo da *International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)*. Todos os resultados foram expressos em unidades por litro (U/L).

### **4.4 Imuno-histoquímica**

#### 4.4.1 Coleta e processamento do tecido

Fragments de fígado foram cuidadosamente dissecados e lavados com solução fisiológica gelada e fixados em formaldeído 4%. Em seguida, os fragmentos foram colocados em caixetas perfuradas e mantidos em solução de formol 10% em tampão fosfato por 24h, até a inclusão em blocos de parafina. O processo de inclusão foi realizado pelo processador automático de

tecido histoquinete (*Jung-Histokinette 2000 Leica, Nussloch, Alemanha*), com duração aproximada de 14 horas. O processo iniciou-se 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, introduzindo 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 até sua utilização.

#### 4.4.2 Corte dos fragmentos do tecido

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*), que permaneceram em estufa (*Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil*) a 60°C por 2 horas e, posteriormente, foram armazenadas em temperatura ambiente até a utilização [Santana, 2013].

#### 4.4.3 Desparafinização

As lâminas passaram por um processo de desparafinização, ou seja, permaneceram por 9 minutos em xilol (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) por 3 vezes. Em seguida, as lâminas foram desidratadas, através de banho em etanol absoluto (2 vezes) (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) e etanol 96% (2 vezes). Por fim, as lâminas foram imersas em água destilada e processadas [Santana, 2013].



#### 4.4.4 Identificação de macrófagos M1

Os macrófagos M1 foram identificados no tecido hepático por meio do anticorpo monoclonal anti-monócito/macrófago de rato (anti-ED-1) (*Serotec, Raleigh, EUA*), produzido em camundongo. O método LSAB-AP (*Labeled Streptavidin-Biotin Alkaline Phosphatase – Dako, Carpinteria, USA*) foi utilizado para a localização deste anticorpo, sendo que todo o procedimento 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 levadas em forno micro-ondas (*Sanyo, São Paulo, Brasil*) com potência de 2400 watts por um período de 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-M1 (1:200) durante o período noturno, a 4°C.

No dia seguinte, os cortes foram lavados em TBS por 5 minutos e incubados com o *pool* de anticorpos biotinizados 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L de levamisol 1M (*Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA*) foram acrescentados. Esta solução, por sua vez, permaneceu 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 200X e as células positivas apresentam coloração marrom. O tempo de revelação foi de aproximadamente 10 minutos. As lâminas foram contra-coradas com hemalumbre de Mayer (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) durante 2 minutos, lavadas em água destilada e montadas com glicergel (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) [Santana, 2013; Santana *et al.*, 2013].

#### 4.4.5 Análise das lâminas

Todas as lâminas foram analisadas de maneira que o pesquisador não tivesse ciência de qual grupo seria analisado. A análise na marcação para macrófagos M1 foi realizada pelo método quantitativo, ou seja, foi realizada a contagem de células positiva (coradas em marrom) em toda extensão tecido inserido na lâmina, sob ampliação microscópica de 400X e expressa como células/mm<sup>2</sup>.

### **4.5 Expressão Gênica**

#### 4.5.1 Extração de RNA total

Todas as soluções utilizadas para a extração de RNA foram utilizadas com água deionizada através do sistema Milli-Q (*Millipore, Milli-Q Element A10 System, Massachusetts, EUA*) e tratada com dietilpirocarbonato (*Sigma, St. 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 do tecido hepático, foi submetido a reação com 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*). Para cada mL de homogenato, foram adicionados 200µL de clorofórmio (*Merck, Darmstadt, Alemanha*). Em seguida, a mistura foi novamente homogeneizada e mantida por 3 minutos a temperatura ambiente.

Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 12.000 g a 4°C por 20 minutos. A fase superior contendo RNA foi transferida para um microtubo de 2 mL 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 ressuspensionado em 1 mL de etanol 70% (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) e centrifugado novamente a 12.000g por 10 minutos. Este procedimento foi repetido e o *pellet* suspenso novamente com 50µL de água previamente tratada com dietilpirocarbonato [Santana, 2013].

#### 4.5.2 Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro (*NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Marietta, EUA*) medindo-se absorvância em diferentes comprimentos de onda (260 e 280 nm). Posteriormente, foi calculada a concentração de RNA expresso em µg/mL a partir da absorvância a 260 nm. A leitura de 1 OD corresponde a uma solução pura de RNA em fita-simples na concentração de 40 µg/mL. As contaminações das amostras contendo proteínas, foi determinada utilizando a leitura de 280nm. A razão entre as absorvâncias (260 e 280nm) foi usada como base para a análise, sendo que o valor aceitável é de 1,7 a 2,0.

#### 4.5.3 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 11 µl de uma solução de RNA a 50 ng/µl. A solução foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada

em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 4 µl de tampão [5X] (Tris-HCl 250 mM pH=8,3, KCL 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM) , 2 µl de DTT 0,1M, 1 µl de dNTP Mix (10mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e 1 µl (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. Para esta etapa foram confeccionados pares de *primers* para a obtenção de *amplicons* com no máximo 250 pb, conforme a recomendação para PCR em tempo real [Santana, 2013].

#### 4.5.4 PCR em Tempo Real: qPCR

Neste protocolo, 1 µL de cDNA foi acrescido a 7,5 µL de mistura 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 programa de computador do aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (*Applied Biosystems, Singapura*), a partir dos *cycle threshold* (CT) das reações [Santana, 2013].

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

Genes	Primers (5' – 3')	Produto (pb)
TNF- $\alpha$	5' TGGCCCAGACCCTCACACTCA 3'	541
	5' GGCTCAGCCACTCCAGCTGC 3'	
IL-1 $\beta$	5' CCTTGTGCAAGTGTCTGAAGCAGC 3'	248
	5' GCCACAGCTTCTCCACAGCCA 3'	
IL-6	5' CCGGAGAGGAGACTTCACAGAGGA 3'	71
	5' AGCCTCCGACTTGTGAAGTGGTATA 3'	
IL-10	5' TCAGTCACATTTGTTTTCTGCAAA 3'	65
	5' CTGCAAAAGTGGAGCAGTCATT 3'	
MHC Classe I	5' TTCCTGCTACCGTTCCTCAC 3'	65
	5' GGTGTGAGTCCACATACCCA 3'	
MHC Classe II	5' TCAGTCACATTTGTTTTCTGCAAA 3'	65
	5' CTGCAAAAGTGGAGCAGTCATT 3'	
NF- $\kappa$ B	5' ATCAAAGAGCTGGTGGAGGC 3'	188
	5' GAAGGCTGCCTGGATCACTT 3'	
$\beta$ -actina	5' AGGAGTACGATGAGTCCGGCCC 3'	70
	5' GCAGCTCAGTAACAGTCCGCCT 3'	

#### 4.6 Análise de Citocinas por Multiplex/Luminex

A quantificação das citocinas foi realizada através do método multiplex/luminex com o kit MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP (*Millipore Corporation, Billerica, MA, USA*). O ensaio foi realizado no fragmento do fígado dos animais. Foi utilizado o painel *Rat* (cytokine/chemokine - immunoassay), composto por anticorpos para quantificar as seguintes citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante.

Inicialmente, para a extração da proteína total, o fragmento do tecido hepático foi pulverizado em pistilo de vidro, contendo nitrogênio líquido e ressuspenso em 1mL de tampão de lise de proteína (*RIPA Buffer*, *Millipore*<sup>®</sup>) juntamente com o inibidor de protease. 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 [Santana, *et al.*, 2013].

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 foram incubadas por 2 horas e, posteriormente lavadas com *Bioplex Wash Buffer*. Em seguida, foi adicionado em cada amostra anticorpo biotilado e incubado por 1 hora e novas lavagens foram realizadas com *Bioplex Wash Buffer*. Para a análise dos resultados foi utilizado o Software Bio-Plex Manager, versão 4.0 (Bio-Rad) no sistema Bioplex Suspension Array System/Luminex (*Bio-Rad*) [Santana, *et al.*, 2013; Santana, 2013].

#### **4.7 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética para o NF- $\kappa$ B**

Este ensaio (EMSA ou *Gel-Shift*) 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 <sup>32</sup>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) [Santana, *et al.*, 2013].

#### 4.7.1 Extração de proteínas nucleares do tecido hepático

O método usado foi descrito por Rong *et al.* [Rong *et al.*, 1996]. As células foram coletadas em PBS gelado e centrifugadas a 2000 g X 5 minutos X 4°C e o pellet foi ressuspenso em 400 µL de tampão de lise (HEPES 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; KCl 10 mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL; 0,5 mM PMSF; 0,1 mM EDTA) e incubado em gelo durante 15 minutos. Foi adicionado em seguida 10 µL de NP-40 0,5% sob agitação vigorosa, centrifugando-se a 13000 g por 30 segundos a 4°C e, em seguida, o sobrenadante foi descartado.

O *pellet* foi ressuspenso em 20 µL de tampão de extração (HEPES 20 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL; PMSF 0,5 mM) e incubado 20 minutos em gelo sob agitação, centrifugando o extrato à 13000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteínas determinada, estocando as amostras a -80 °C [Santana, *et al.*, 2013; Santana, 2013].

#### 4.7.2 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  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP numa solução



contendo tampão T4 quinase, T4 quinase e água nas concentrações de: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1 U/ $\mu$ L de T4 quinase, 1  $\mu$ L de  $\gamma$ - $^{32}$ P ATP (3 Ci/mmol), 1  $\mu$ L de tampão T4 *Kinase Buffer* (10x) em 10  $\mu$ L de volume de reação. Após incubação a 37°C por 10 minutos, o excesso de  $\gamma$ - $^{32}$ P 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/ $\mu$ L [Santana, *et al.*, 2013; Santana, 2013].

#### 4.7.3 Reação de ligação e corrida do gel

Foram adicionados a um tubo 4 $\mu$ L de tampão de ligação 5x (MgCl<sub>2</sub> 5mM; EDTA 2,5mM; DTT 2,5mM; NaCl 300mM; Tris-HCl 50mM pH 7,5; Poly dIdc 0,25 $\mu$ g/ $\mu$ L e glicerol 20%); extrato nuclear em quantidade suficiente para 5 $\mu$ g de proteína; oligo frio em excesso; e H<sub>2</sub>O q.s.p. para 20 $\mu$ L 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 (1 $\mu$ L) e novamente incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de 1 $\mu$ L de Azul de Bromofenol ao controle negativo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poli-acrilamida 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  $-80^{\circ}\text{C}$  [Santana, *et al.*, 2013; Santana, 2013].

#### 4.7.4 Ensaio de *Super-Shift*

Os ensaios de *Super-Shift* do gel de retardo para NF- $\kappa$ B foi realizado de maneira idêntica aos procedimentos descritos anteriormente. Foram adicionados anticorpos específicos às subunidades que compõe o complexo NF- $\kappa$ B, durante o processo de incubação do extrato nuclear com o oligonucleotídeo, contendo a sequência específica do NF- $\kappa$ B. Para tanto, foram utilizados os anticorpos p50, p65 e c-Rel (Santa Cruz, CA, USA).

### **4.8 Análise Estatística**

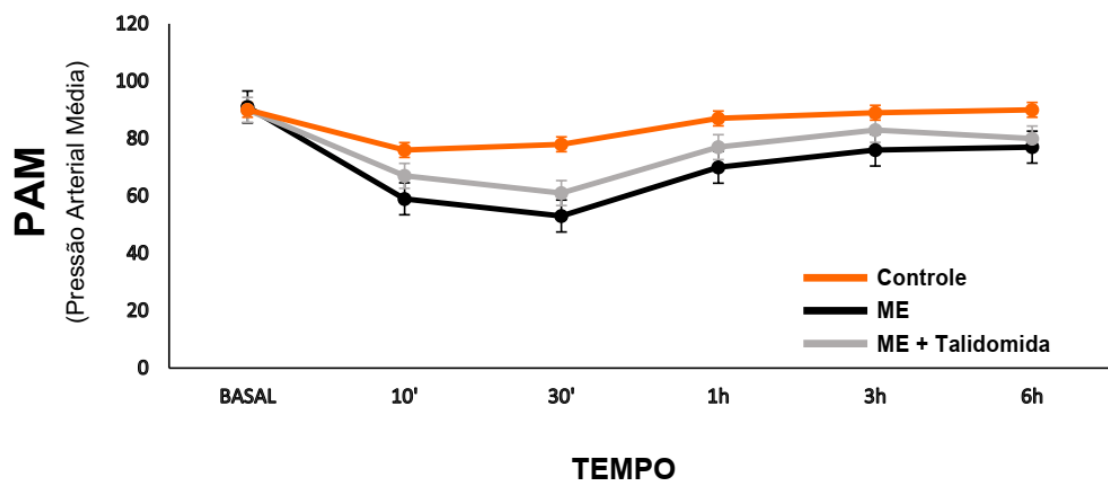
A normalidade da distribuição dos dados foi verificada por meio de assimetria, estatísticas de curtose e métodos gráficos. O software estatístico SPSS (versão 24.0; IBM, Armonk, New York, USA) foi utilizado para realizar as análises estatísticas. As análises estatísticas dos resultados da *gel-shift* foram realizadas com o programa estatístico Prism (*GraphPad, San Diego, EUA*). Foi usada ANOVA para comparações de pares de acordo com a formulação de Newman-Keuls. Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão. A significância estatística foi considerada a partir do  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise da Pressão Arterial Média (PAM)

Após a indução da morte encefálica, houve intensa elevação da pressão arterial seguido de queda, indicando intensa atividade da resposta autonômica simpática. A dose de talidomida utilizada no presente estudo foi bem tolerada e não afetou a estabilidade hemodinâmica dos animais. Os valores da PAM nos grupos foram mantidos acima de 50 mmHg durante todo o período de acompanhamento, sem necessidade de uso de drogas vasoativas ou colóides. Embora os animais do grupo controle apresentaram PAM mais elevada, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos diferentes tempos analisados. Os resultados encontram-se ilustrados na **Figura 7**.



**Figura 7.** Análise comparativa da evolução da PAM entre os grupos experimentais durante um período de 6 horas após a indução da morte encefálica.

## 5.2 Análise das Concentrações Plasmáticas de AST, ALT, LDH e FA

As análises bioquímicas no plasma dos grupos estudados, revelaram que os animais do grupo ME apresentaram valores significativamente elevados de AST, ALT, LDH e FA, quando comparado aos grupos controle e tratados com talidomida. O tratamento com talidomida reduziu significativamente a concentração dessas enzimas, sugerindo um potente efeito protetor hepático da talidomida (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Análise comparativa das enzimas indicadoras de lesão hepática entre os diferentes grupos experimentais.

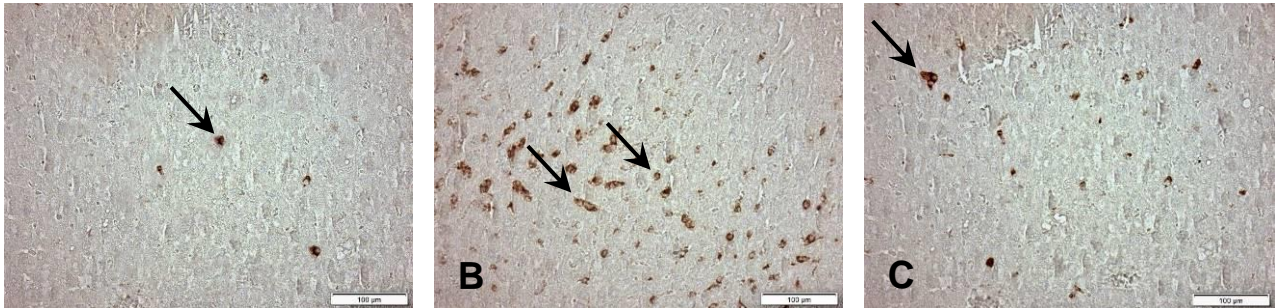
Parâmetros (IU/L)	GRUPOS		
	Controle	ME	ME + Talidomida
ALT	66,6±9,2	232,7±40,9*	83,4±5,2 <sup>#</sup>
AST	140,1±3,9k	349,2±26,5*	230,7±32,2 <sup>#</sup>
LDH	267,1±17,7	411,1±12,4*	244,9±30,2 <sup>#</sup>
FA	99,2±9,5	135,8±13,2*	102,4±8,7 <sup>#</sup>

\*p<0.05 vs. Controle; <sup>#</sup>p<0.05 vs. ME.

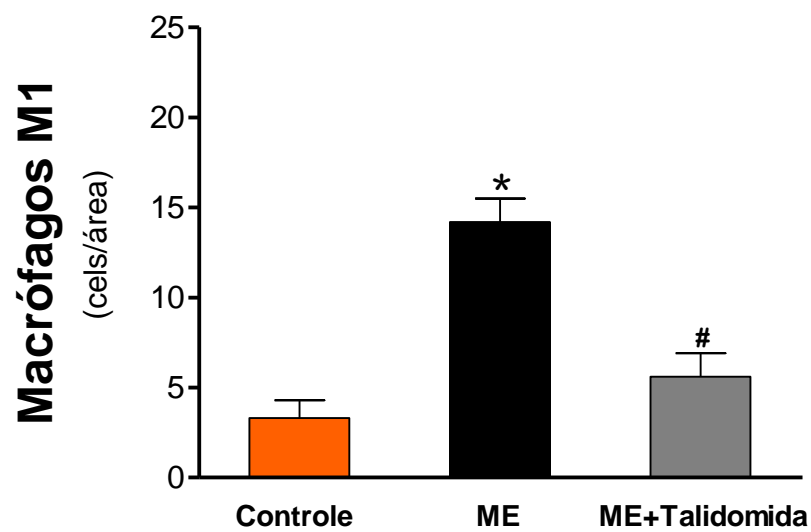
## 5.3 Imuno-histoquímica para Macrófagos M1

No grupo ME houve um significativo infiltrado de macrófagos no tecido hepático em comparação ao grupo controle (14,2±1,3 vs. 3,3±1,0 cels/mm<sup>2</sup>; p<0,05). O tratamento com talidomida promoveu uma diminuição significativa na infiltração desses macrófagos quando comparados aos animais do grupo ME (5,6±1,3 vs. 14,2±1,3 cels/mm<sup>2</sup>; p<0,05). Não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratados com talidomida. As microfotografias

representativas estão ilustradas nas **Figuras 8A-C**. A quantificação desses macrófagos é mostrada em forma gráfica na **Figura 9**.



**Figura 8.** Imuno-histoquímica para detecção de macrófagos M1 (setas) no tecido hepático 6 horas após a indução da morte encefálica. **(A)** Controle; **(B)** ME; **(C)** ME + Talidomida. Aumento 400X.



**Figura 9.** Quantificação do infiltrado de macrófagos M1 no tecido hepático nos diferentes grupos experimentais. \* $p < 0.05$  vs. Controle; # $p < 0.05$  vs. ME.

#### 5.4. Análise dos Mediadores Inflamatórios no Tecido Hepático

Afim de identificar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no tecido hepático durante a morte encefálica, associada ao tratamento com talidomida, mediadores inflamatórios foram analisados por PCR em tempo real e ensaios MULTIPLEX/LUMINEX. Foram quantificadas as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, além da citocina anti-inflamatória IL-10.

De uma maneira geral, os animais do grupo ME apresentaram níveis significativamente aumentados da expressão gênica e da concentração proteica das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em relação ao grupo controle, indicando intenso processo imunológico local. Por outro lado, os animais tratados com talidomida, apresentaram diminuição significativa tanto na expressão, quanto na concentração tecidual de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, corroborando as propriedades imunomodulatórias da talidomida. Vale ressaltar, que os valores obtidos na concentração proteica dessas citocinas, alcançaram níveis equivalentes aos do grupo controle, indicando resgate completo dos parâmetros imunológicos basais no tecido hepático.

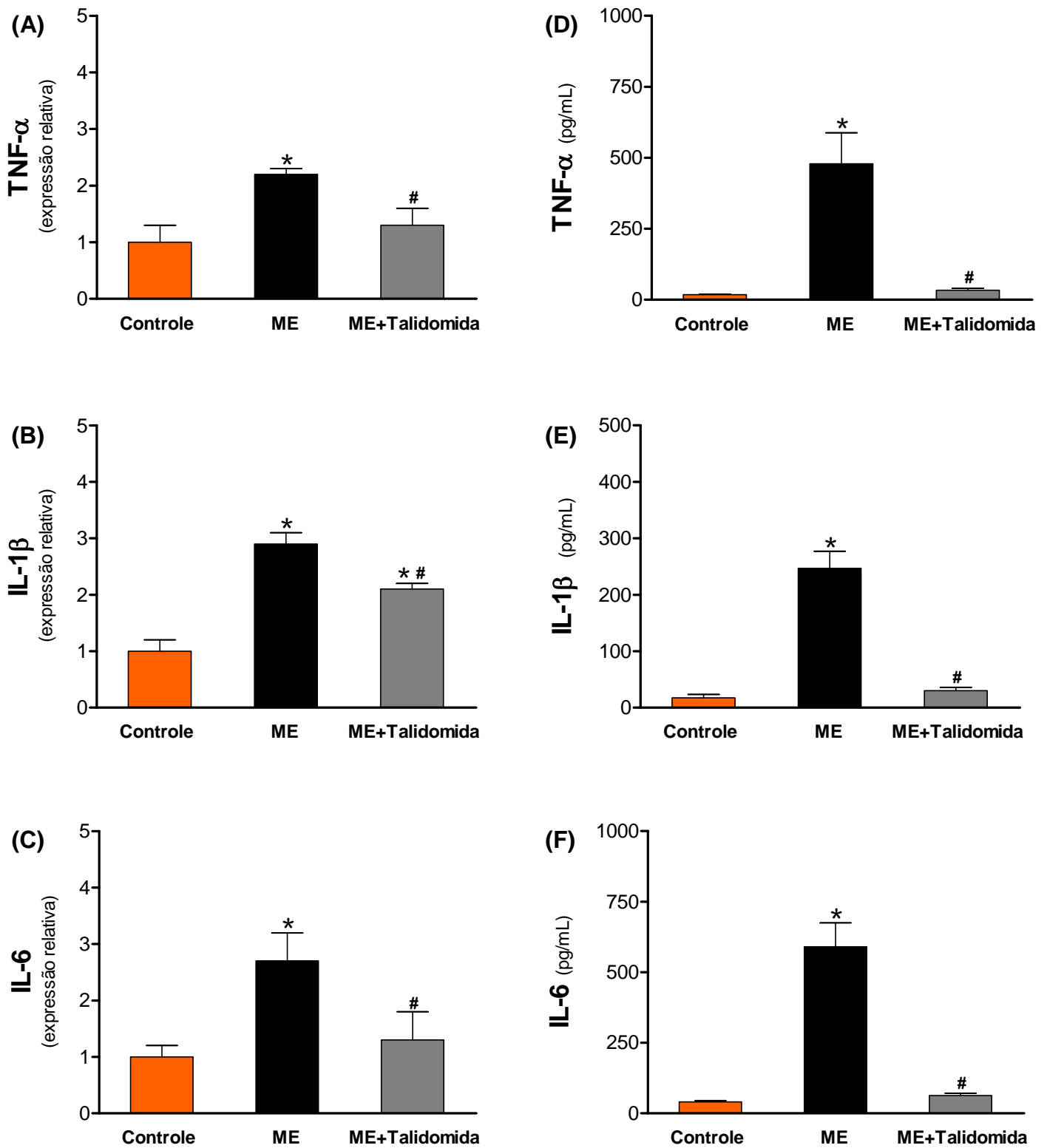
As análises da expressão de IL-10, por sua vez, não mostraram diferença significativa entre os grupos. Os resultados estão expressos na **Tabela 3** e ilustrados de forma gráfica na **Figura 10**.

**Tabela 3.** Análise comparativa dos mediadores inflamatórios no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais.

Citocinas	GRUPOS					
	Controle		ME		ME + Talidomida	
	RNA <sub>m</sub> (expressão relativa)	Proteína (pg/ml)	RNA <sub>m</sub> (expressão relativa)	Proteína (pg/ml)	RNA <sub>m</sub> (expressão relativa)	Proteína (pg/ml)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1,0 $\pm$ 0,1	17,9 $\pm$ 1,9	2,2 $\pm$ 0,1*	478,8 $\pm$ 109,5*	1,3 $\pm$ 0,3 <sup>#</sup>	33,6 $\pm$ 6,7 <sup>#</sup>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	1,0 $\pm$ 0,2	17,3 $\pm$ 2,4	2,9 $\pm$ 0,2*	247,0 $\pm$ 29,8*	2,1 $\pm$ 0,1 <sup>#,*</sup>	30,0 $\pm$ 1,7 <sup>#</sup>
<b>IL-6</b>	1,0 $\pm$ 0,2	40,8 $\pm$ 4,8	2,7 $\pm$ 0,5*	590,5 $\pm$ 84,7*	1,3 $\pm$ 0,5 <sup>#</sup>	63,4 $\pm$ 8,3 <sup>#</sup>
<b>IL-10</b>	1,0 $\pm$ 0,4	13,2 $\pm$ 0,6	0,9 $\pm$ 0,4	17,6 $\pm$ 2,2	1,1 $\pm$ 0,6	14,7 $\pm$ 1,0

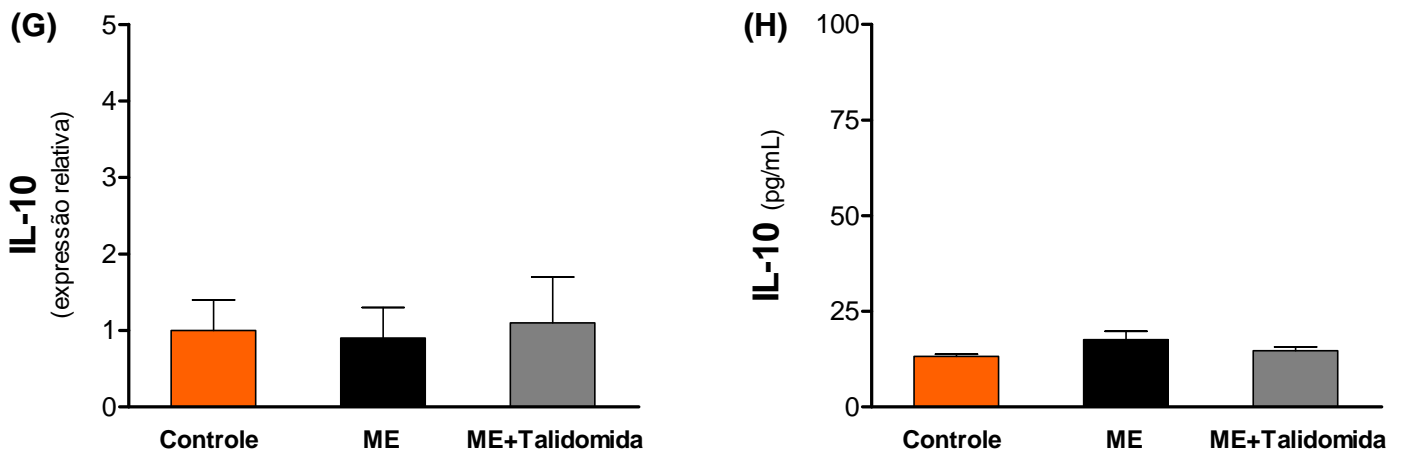
\*p<0.05 vs. Controle; <sup>#</sup>p<0.05 vs. ME.





**Figura 10.** Análise comparativa da expressão gênica e da concentração dos medidores inflamatórios no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais.

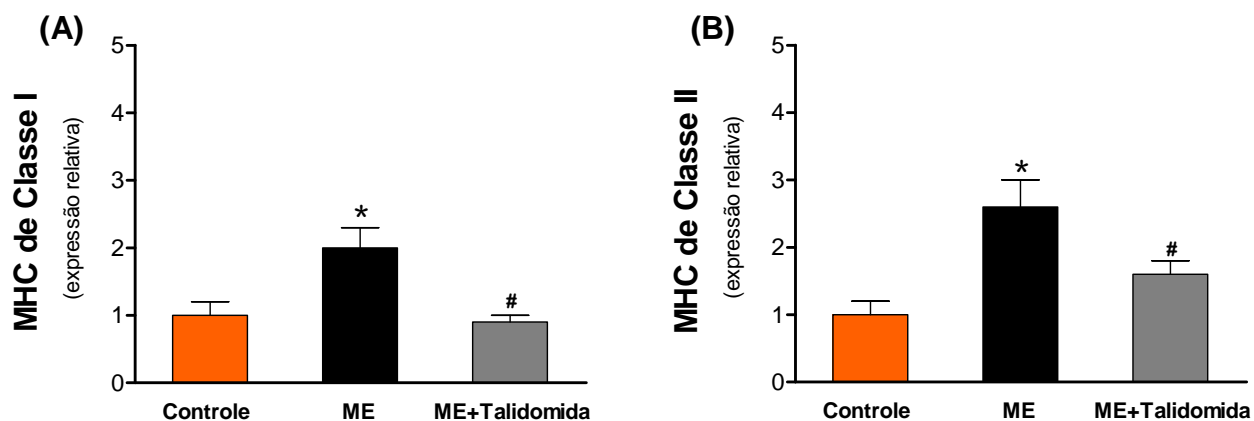
\* $p < 0.05$  vs. Controle; # $p < 0.05$  vs. ME.



**Figura 10.** Análise comparativa da expressão gênica e da concentração dos medidores inflamatórios no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais. \* $p < 0.05$  vs. Controle; # $p < 0.05$  vs. ME.

### 5.5. Detecção de MHC de Classe I e MHC de Classe II

Na **Figura 11** estão apresentadas as expressões (determinadas por meio de PCR em tempo real) de duas importantes moléculas relacionadas com a imunogenicidade no transplantes de órgãos, o MHC de Classe I e o MHC de Classe II. A expressão hepática de cada uma dessas moléculas aumentou significativamente no grupo ME em relação ao grupo controle, sendo significativamente atenuada e, até mesmo normalizada, pelo tratamento com talidomida. Digno de nota é o fato que os níveis expressos dessas moléculas, especialmente o MHC de classe I, foram semelhantes aos do grupo controle, indicando potente imunorregulação local pela talidomida. Os resultados estão expostos na **Tabela 4**.



**Figura 11.** Análise comparativa da expressão gênica de MHC de Classe I e MHC de Classe II no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais. \* $p < 0.05$  vs. Controle; # $p < 0.05$  vs. ME.

**Tabela 4.** Análise comparativa da expressão de MHC de Classe I e MHC de Classe II no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais.

mRNA (expressão relativa)	GRUPOS		
	Controle	ME	ME + Talidomida
<b>MHC de Classe I</b>	1,0±0,2	2,0±0,3*	0,9±0,1#
<b>MHC de Classe II</b>	1,0±0,2	2,6±0,4*	1,6±0,2#

\* $p < 0.05$  vs. Controle; # $p < 0.05$  vs. ME.

## 5.6. Concentração Plasmática dos Mediadores Inflamatórios

Com o intuito de avaliar a repercussão sistêmica da resposta imunológica neste modelo experimental, as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-6, além da citocina anti-inflamatória IL-10 foram dosadas no plasma dos animais por meio de ensaios MULTIPLEX/LUMINEX.

As análises revelaram que os animais do grupo ME apresentaram aumento significativo na concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-6 em relação aos animais do grupo controle. O grupo que recebeu talidomida, entretanto, apresentou um padrão similar ao observado pela análise no tecido hepático, ou seja, redução significativa destas citocinas, indicando potente imunorregulação sistêmica. As análises da IL-10 não revelaram diferenças significativas entre os grupos. Os resultados estão expressos na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Análise comparativa dos mediadores inflamatórios no plasma entre os diferentes grupos experimentais.

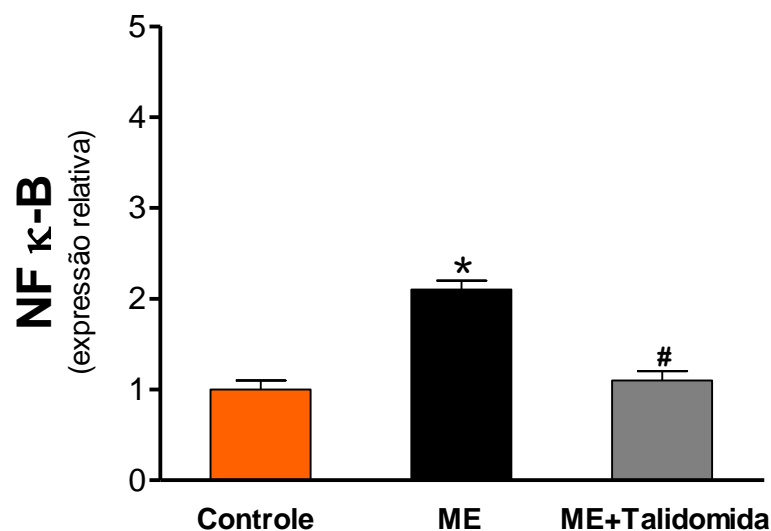
Parâmetros (pg/mL)	GRUPOS		
	Controle	ME	ME + Talidomida
TNF- $\alpha$	2,1 $\pm$ 0,4	46,8 $\pm$ 1,4*	4,6 $\pm$ 0,9 <sup>#</sup>
IL-1 $\beta$	0,8 $\pm$ 0,4	27,9 $\pm$ 4,0*	2,4 $\pm$ 0,4 <sup>#</sup>
IL-6	2.966,5 $\pm$ 793,7	9.310,0 $\pm$ 976,8*	3.689,5 $\pm$ 634,6 <sup>#</sup>
IL-10	307,7 $\pm$ 70,3	355,3 $\pm$ 94,6	121,8 $\pm$ 22,4

\*p<0.05 vs. Controle; <sup>#</sup>p<0.05 vs. ME.

### 5.7. Análise da Expressão e da Atividade do NF $\kappa$ B

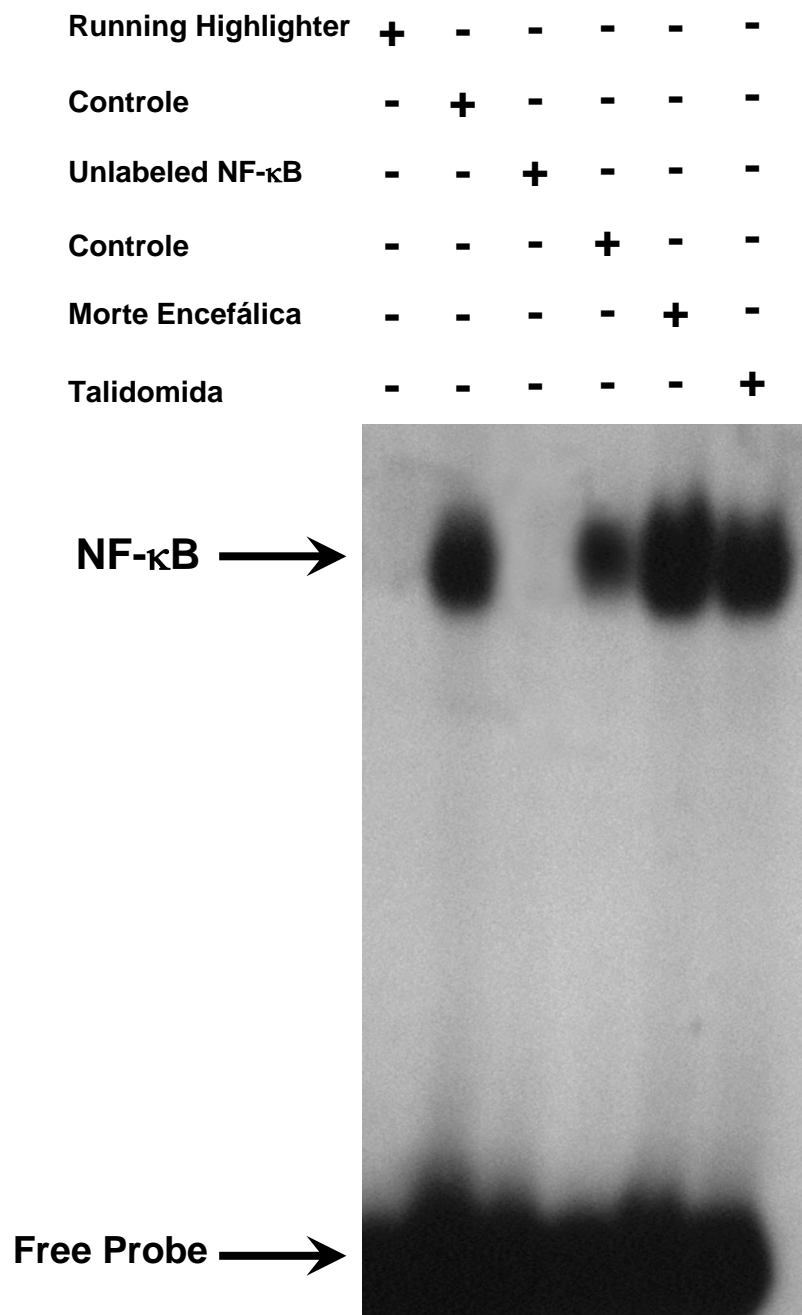
Para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na morte encefálica, foram realizadas análises da expressão e da atividade do NF- $\kappa$ B, pelos métodos RT-PCR e *Gel-Shift* (respectivamente) no tecido hepático.

A expressão gênica de NFκB foi significativamente maior no grupo ME em relação ao grupo controle ( $1,0 \pm 0,1$  vs.  $2,1 \pm 0,1$  expressão relativa;  $p < 0,05$ ). O grupo tratado com talidomida, por sua vez, apresentou diminuição significativa na expressão gênica de NFκB ( $2,1 \pm 0,1$  vs.  $1,1 \pm 0,1$  expressão relativa;  $p < 0,05$ ), corroborando os mecanismos imunomoduladores da talidomida (**Figura 12**).

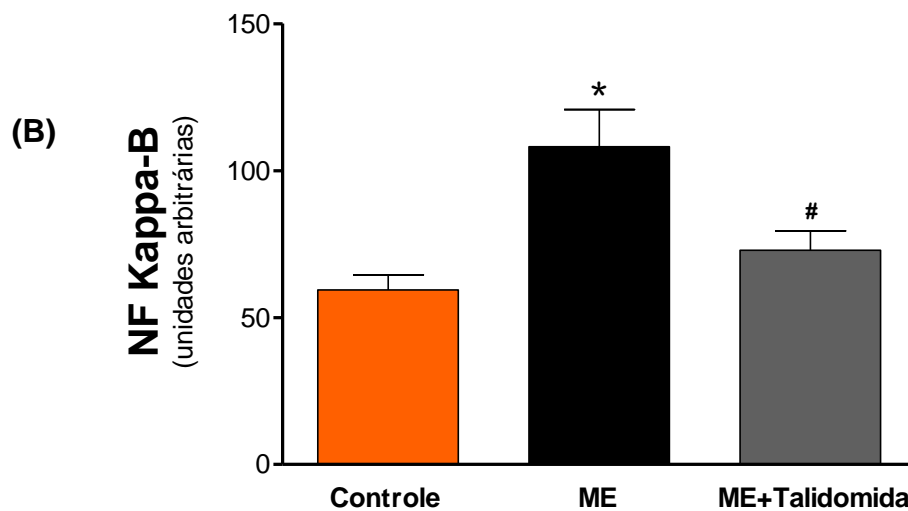


**Figura 12.** Análise comparativa da expressão gênica de NFκB no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais. \* $p < 0,05$  vs. Controle; # $p < 0,05$  vs. ME.

Em paralelo, as análises pelo ensaio *Gel-Shift* mostraram que os animais do grupo Controle apresentaram bandas pouco visíveis. Em contraste, os animais do grupo ME apresentaram bandas densas, indicando ativação do NFκB. Nos animais tratados com talidomida, as bandas mostraram-se rarefeitas e comparáveis às observadas nos animais do grupo controle, indicando bloqueio da ativação do NFκB pela talidomida (**Figura 13**). A quantificação dessas bandas por densitometria é mostrada de forma gráfica na **Figura 14**, na qual as diferenças apontadas são mais claramente visíveis.



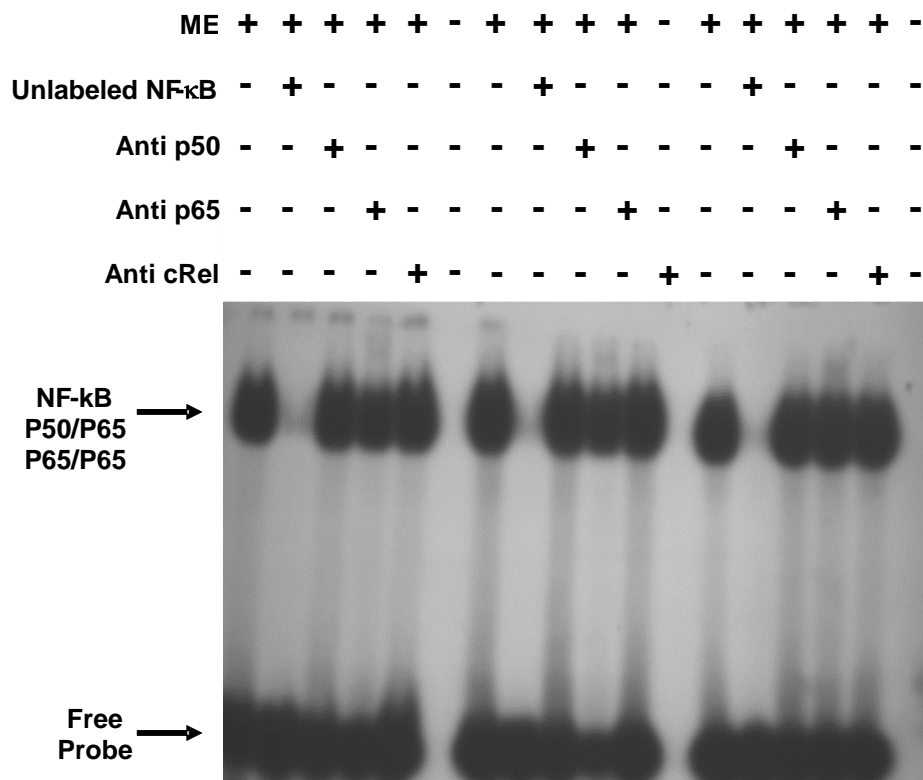
**Figura 13.** Ensaio de *Gel-Shift* para NF-κB no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais. Composição do complexo de ligação de NF-κB/DNA específico e a sonda livre são indicadas (setas).



**Figura 14.** Análise da quantificação densiométrica (unidades arbitrárias) da banda de NF- $\kappa$ B no tecido hepático entre os diferentes grupos experimentais. \* $p < 0.05$  vs. Controle; # $p < 0.05$  vs. ME.

### 5.8. Análise das subunidades p50, p65 e c-Rel

Para as subunidades envolvidos na ativação do NF- $\kappa$ B foi realizado o ensaio de *Super-Shift* para identificar a composição dos dímeros que estavam presentes no núcleo da células do tecido hepático. As análises de *Super-Shift* indicaram que os anticorpos contra as subunidades p50 e p65 induziram uma diminuição parcial no complexo NF- $\kappa$ B. Por outro lado, a presença de anticorpos contra a subunidade c-Rel não afetou os complexos DNA-proteína. Portanto, tomados em conjunto, estes resultados indicam que os heterodímeros p50/p65 e os homodímeros p65/p65 foram inseridos no complexo NF- $\kappa$ B/DNA. As imagens radiográficas representativas do ensaio *Super-Shift* estão ilustradas na **Figura 15**.



**Figura 15.** Imagem ilustrativa do ensaio *Super-Shift*, 6 horas após a indução da morte encefálica (grupo ME), indicando a presença/ausência das subunidades p50, p65 e c-Rel, no tecido hepático.



## 6 DISCUSSÃO

## 6. DISCUSSÃO

A doação de órgãos para transplantes tem evoluído ao longo dos anos, especialmente em face ao desenvolvimento do diagnóstico da morte encefálica [Power *et al.*, 1995; Novitzky *et al.*, 1987]. A morte encefálica, por sua vez, é considerada como evento inicial de uma série de alterações de natureza bioquímica, biofísica, molecular e imunológica, responsáveis por efeitos deletérios progressivos na estrutura e função dos órgãos somáticos potencialmente transplantáveis [Martins *et al.*, 2006]. Dentre estes efeitos, destacam-se anormalidades cardiovasculares, alterações hormonais, desarranjos metabólicos, além de eventos imunológicos [Power *et al.*, 1995; Novitzky *et al.*, 1987].

O manejo dessas condições, de modo geral, concentra-se no suporte hemodinâmico e no controle endócrino-metabólico, enquanto a manutenção da resposta imunológica tem recebido pouca atenção [Cooper *et al.*, 1988]. Múltiplos estudos apoiam fortemente o conceito que a resposta imunológica, induzida pela morte encefálica, está intimamente implicada com a imunogenicidade do enxerto e, conseqüentemente, no impacto potencial da sobrevida do órgão transplantado [Martins *et al.*, 2006]. Além disso, as complexas alterações imunopatológicas observadas nos órgãos periféricos, associadas à morte encefálica, são ainda pouco compreendidas [Zhang *et al.*, 2008].

Com o objetivo de elucidar os complexos mecanismos imunopatogênicos envolvidos nessa condição, usamos um modelo experimental de morte

encefálica, que reproduz as principais características observadas em humanos com diagnóstico de morte encefálica sendo, portanto, ferramenta fundamental para estudos *in vivo*, bem como para testes e análises de novas estratégias terapêuticas.

Inicialmente, tecemos a hipótese de que o NFκB pudesse desempenhar um papel central na regulação da resposta imune nos órgãos periféricos e, portanto, o bloqueio de sua atividade pudesse ter efeito protetor contra a imunogenicidade do tecido hepático. De fato, há inúmeras evidências clínicas e experimentais mostrando que o NFκB regula genes ligados à imunidade inata e adaptativa, apoptose, adesão celular, entre outros [Zhang *et al.*, 2017; Danobeitia *et al.*, 2012, Martins *et al.*, 2006]. Nesse contexto, com o intuito de reforçar nossa hipótese, investigamos os efeitos da talidomida no presente modelo, com base em fortes evidências que mostraram seu papel significativo, como potente droga com propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras [Chen *et al.*, 2020; Santana *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2004; Majumdar *et al.*, 2002].

Inicialmente, nossas análises mostraram que o modelo experimental de morte encefálica é significativamente reprodutível dentro de uma sequência metodológica meramente técnica. Adicionalmente, realizamos ultrassonografia transcraniana colorida, como exame subsidiário, para determinação do diagnóstico de morte encefálica. Foram avaliadas as artérias intracranianas (artéria cerebral interna, artéria cerebral média direita e artéria basilar) e, como esperado, verificou-se interrupção do fluxo sanguíneo nos vasos estudados, compatível com colapso circulatório encefálico. Devido à

necessidade de um operador especializado, poucos estudos experimentais utilizam exames complementares para o diagnóstico de morte encefálica.

Como esperado, as análises da monitorização da pressão arterial revelaram que imediatamente após a indução da morte encefálica, os animais apresentaram aumento súbito da PAM. Em seguida, os animais apresentaram diminuição da pressão arterial, mantendo níveis pressóricos considerados normais e controlados durante o *follow-up*. Sabe-se que o aumento da pressão arterial durante as fases iniciais da morte encefálica é desencadeado por uma intensa atividade simpática secundária desenfreada (tempestade adrenérgica) de curta duração, fato que traduz relação secundária e transitória à isquemia do tronco encefálico [Essien *et al.*, 2017; Tuttle-Newhall *et al.*, 2003]. Posteriormente, há diminuição dos níveis séricos de catecolaminas, devido a lesões das estruturas vasomotoras centrais, causadas pela disfunção neuronal generalizada, que acarreta na diminuição do inotropismo e cronotropismo, baixo débito cardíaco e, conseqüentemente, diminuição dos níveis pressóricos [Tuttle-Newhall *et al.*, 2003].

Nossas análises no tecido sanguíneo mostraram aumento nas concentrações plasmáticas das enzimas hepáticas (AST, ALT, LDH e FA), além das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) nos animais submetidos à morte encefálica, corroborando estudos anteriores [Tuttle-Newhall *et al.*, 2003, Martins *et al.*, 2006]. Esses achados reforçam a hipótese de que o insulto neurológico desencadeia uma resposta neuroinflamatória, resultando no comprometimento funcional da BHE, no qual predispõe um fluxo bidirecional dos componentes imunológicos entre o SNC e a circulação sistêmica

[Shlosberg *et al.*, 2010]. As citocinas derivadas do SNC, especialmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, ficam livres para interagir nos receptores localizados na superfície dos tecidos periféricos, culminando no recrutamento de células inflamatórias que induzem resposta intracelular local [Barklin, 2009].

Na vigência desse ambiente inflamatório, células endoteliais apresentam a habilidade de rapidamente sintetizar e liberar citocinas e fatores de crescimento, que por sua vez, são potentes moduladores não apenas no contexto imunológico, mas também na regulação de fenômenos de hemostasia e trombose [Das *et al.*, 2012]. De fato, o endotélio interage com plaquetas da circulação que, em associação com os leucócitos, formam grumos que podem obstruir a microcirculação, levando a danos isquêmicos diretos [Das *et al.*, 2012].

Os fatores pró-inflamatórios também apresentam efeitos relevantes nas células hepáticas, induzindo a síntese de mediadores químicos (CCL2/MCP-1 e CXCL1), expressão de MHC de classe II, apoptose, entre outros [Watts *et al.*, 2018; Van der hoeven *et al.*, 2003]. A produção local dessas moléculas tem importância, pois além de aumentar a infiltração/expansão de macrófagos no interstício, causam lesão celular e declínio da função hepática e vascular [Watts *et al.*, 2018].

Destarte, fatores oriundos de células hepáticas podem ser utilizados pelas próprias células (efeito autócrino) ou pelas células adjacentes (efeito parácrino), perpetuando a resposta imune e as anormalidades funcionais [Fernandez-Martinez, 2006]. Ou seja, como houve um fenômeno imunológico

sistêmico, conseqüentemente houve lesão do tecido hepático, o que levou, portanto, ao aumento das enzimas na circulação.

No presente estudo, também observamos acúmulo de macrófagos no fígado, identificados por imuno-histoquímica. Esse achado é reflexo dos efeitos quimiotáticos sob ação de mediadores liberados no local da lesão que recrutam grande quantidade de monócitos, que são ativados (via clássica) e diferenciados em macrófagos M1 [Gordon, 2003].

Nossos experimentos de PCR em tempo real e os ensaios MULTIPLEX/LUMINEX, demonstraram níveis aumentados tanto de mRNA, quanto na concentração das citocinas pró-inflamatórias nas amostras de tecido hepático no grupo ME. Estes achados estão em consenso com a literatura [Watts *et al.*, 2018]. De fato, durante o processo inflamatório células endoteliais e hepáticas expressam receptores para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , levando a expressão gênica, com conseqüente síntese proteica dessas citocinas [Danobeitia *et al.*, 2012].

Em paralelo, a IL-6 circulante é sequestrada pelo fígado e funciona como gatilho na produção e liberação de proteínas de fase aguda, tais como proteína C reativa, amiloide A sérico,  $\alpha$ 1-antiquimotripsina e fibrinogênio [Schett, 2018]. Concomitantemente, a IL-6 atua sobre os hepatócitos induzindo a formação de CCL2/MCP-1 potencializando o infiltrado inflamatório local [Mandrekar *et al.*, 2011].

É interessante ressaltar, que a regulação da síntese de citocinas envolve, principalmente, mecanismos de natureza molecular (transcrição gênica) em

que o mRNA confere ao sistema um controle eficiente na regulação desses fatores [Liu *et al.*, 2016]. Tomados em conjunto, tais observações permitem concluir que a fisiopatologia da morte encefálica é um processo dinâmico não restrito ao SNC, mas com notáveis efeitos sistêmicos, especialmente nos tecidos vascular e hepático.

Considerado padrão ouro do nosso trabalho, o estudo da expressão e do NF- $\kappa$ B e das moléculas MHC, avaliados pelos ensaios de *Gel-Shift* e pelos níveis de mRNA mostraram expressões aumentadas, tanto de NF- $\kappa$ B, como de moléculas MHC de classe I e MHC de classe II no fígado, reforçando a hipótese de que a imunogenicidade do enxerto pode ser orquestrada, em certa dimensão, pelo NF- $\kappa$ B durante uma resposta imune [Liu *et al.*, 2016, Forloni *et al.*, 2010].

A explicação para tais achados pode estar intimamente ancorada nos conceitos fisiopatológicos do NF- $\kappa$ B. Nesse contexto, a ativação do NF- $\kappa$ B, pela via canônica, é desencadeada por sinais que ativam o complexo IKK, com posterior fosforilação do I $\kappa$ B (ubiquitinação e degradação por proteossomas) no compartimento citoplasmático, permitindo que a forma dimérica ativa do NF- $\kappa$ B (complexo p65/p50), transloque-se ao núcleo, ligando-se no DNA e regulando a transcrição de genes alvos [Liu *et al.*, 2016; Majumdar *et al.*, 2002]. Sabe-se atualmente que o NF- $\kappa$ B pode ser ativado pelo TNF- $\alpha$  (receptores TNFR) e pela IL-1 $\beta$  (receptores IL-1R), bem como por espécies reativas de oxigênio, moléculas de adesão, além da ativação dos TLRs [Liu *et al.*, 2016]. Conseqüentemente, há aumento da expressão de MHC de classe I, além das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, todas

essenciais no mecanismo de alorreconhecimento após o transplante [Forloni *et al.*, 2010]. Outros estudos também reportaram que o NF- $\kappa$ B atua como um modulador crítico no controle da apoptose [Majumdar *et al.*, 2002].

Seguindo essa linha conceitual, alguns estudos demonstraram que o TNF- $\alpha$ , potencializa a expressão de MHC de classe II [Keller, *et al.*, 2011; Kittur *et al.*, 2002], o que propicia concluir que o balanço entre as ações coordenadas entre NF- $\kappa$ B e citocinas, permite regular a imunogenicidade em um processo de retroalimentação positiva.

Nesse contexto, postulamos o tratamento com talidomida, uma droga cujos efeitos envolvidos na imunoregulação vem sendo cada vez mais confirmados na literatura.

Estudando-se o mecanismo de ação da droga, gradualmente foram descritos seus efeitos na modulação de alguns tipos de reações imunes, passando-se a utilizá-la não somente em pacientes com hanseníase, mas também naqueles pacientes HIV soro-positivos e em uma variedade de doenças associadas a distúrbios imunológicos, como mieloma múltiplo, esclerose múltipla e doença inflamatória intestinal, entre outras [Tansey *et al.*, 2001].

De maneira mais específica, diversos experimentos mostraram que a talidomida é um potente inibidor da expressão do NF- $\kappa$ B, através do bloqueio da ativação do complexo IKK e da degradação do I $\kappa$ B, particularmente quando a cascata de sinalização é desencadeada pelo TNF- $\alpha$  [Majumdar *et al.*, 2002; Keifer *et al.*, 2001]. Em um estudo clássico na década de 90, Sampaio *et al.* verificaram que, em macrófagos e monócitos “*in vitro*”, a



talidomida atuou na degradação do mRNA do TNF- $\alpha$ , caracterizado pela redução de sua meia vida (~30 para ~17 minutos) [Sampaio *et al.*, 1993].

Com base na análise integrada dessas observações, nossos resultados sugerem que a diminuição da imunogenicidade do tecido hepático, provavelmente ocorreu pelos efeitos imunomoduladores da talidomida, principalmente pela diminuição da expressão do NF- $\kappa$ B.

No entanto, atualmente a talidomida continua associada aos efeitos teratogênicos que foram devastadores no passado. Médicos e pesquisadores ainda têm receio irracional de usar e/ou estudar a droga, mesmo em populações fora da idade reprodutiva ou em homens, por seus efeitos nas mulheres grávidas.

A população-alvo proposta para o uso da droga, conforme sugerido pelo presente estudo, seria de doadores de órgãos com diagnóstico de morte encefálica, ou seja, com segurança e viabilidade clínica. A utilização da talidomida seria em instituições hospitalares sob o gerenciamento da Organização de Procura de Órgãos (OPO), responsável pela operacionalização e demais procedimentos para obtenção de órgãos e tecidos para transplantes.

Além disso, a condução de pesquisas e o desenvolvimento de novos medicamentos são processos longos e altamente dispendiosos, não sendo razoável privar os medicamentos já existentes, testando e maximizando seus benefícios com comprovada segurança, adequadamente amparados na ciência.

É indubitável, por fim, que o entendimento progressivo da imunopatogênese durante a morte encefálica, além do estudo de novas terapias, continuará a desenhar progressos científicos nessa área, podendo traduzir em um grande impacto no processo de doação e transplantes de órgãos.

## 7 CONCLUSÕES

## 7. CONCLUSÕES

### **Primária:**

- ✓ A talidomida exerceu um potente efeito imunomodulador no modelo experimental de morte encefálica.

### **Secundária:**

- ✓ O tratamento com talidomida reduziu significativamente as citocinas pró-inflamatórias e o infiltrado de macrófagos, confirmando o envolvimento da resposta imune durante a morte encefálica;
- ✓ A talidomida diminuiu significativamente a atividade do NF- $\kappa$ B no tecido hepático, provavelmente devido aos seus efeitos imunomodulatórios;
- ✓ O tratamento com talidomida foi eficaz em diminuir a alogenicidade no tecido hepático, mecanismo aparentemente mediado pela atividade do NF- $\kappa$ B;
- ✓ A talidomida melhorou significativamente os níveis das enzimas hepáticas.

## 8 REFERÊNCIAS

## 8. REFERÊNCIAS

1. Barker, C. F. and Markmann, J. F. Historical Overview of Transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3, 014977 (2013).
2. Pratschke, J., Neuhaus, P. & Tullius, S. G. What can be learned from brain-death models? *Transpl. Int.* 18, 15-21 (2005).
3. Floerchinger, B., Oberhuber, R. & Tullius, S. G. Effects of brain death on organ quality and transplant outcome. *Transplant. Rev.* 26, 54-59 (2012).
4. Danobeitia, J. S. The brain-dead organ donor: a missed opportunity for early intervention. *J. Transplant. Technol. Res.* 2, 3 (2012).
5. Van der Hoeven, J. A. *et al.* Donor brain death reduces survival after transplantation in rat livers preserved for 20 hr. *Transplantation.* 72, 1632-1636 (2001)
6. Bugge, J. F. Brain death and its implications for management of the potential organ donor. *Acta. Anaesthesiol.* 53, 1239-1250 (2009).
7. Smith, M. Physiologic changes during brain stem death--lessons for management of the organ donor. *J. Heart. Lung. Transplant.* 23, 217-222 (2004).
8. Majumdar, S., Lamothe, B. & Aggarwal, B. B. Thalidomide suppresses NF- $\kappa$ B activation induced by TNF and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. *J. Immunol.* 168, 2644-2651 (2002).
9. A definition of irreversible coma. Report of the Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to Examine the Definition of Brain Death. *JAMA.* 205, 337-340 (1968).
10. Martins, M. A. *et al.* Modifying graft immunogenicity and immune response prior to transplantation: potential clinical applications of donor and graft treatment. *Transpl Int.* 19, 351-359 (2006).
11. Mollaret, P. e Goulon, M. Le coma dépassé. *Rev. Neurol.* 101, 3-15 (1959).

12. Brink, J. G. e Hassoulas, J. The first human heart transplant and further advances in cardiac transplantation at Groote Schuur Hospital and the University of Cape Town - with reference to : the operation. A human cardiac transplant : an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *Cardiovasc. J. Afr.* 20, 31-35 (2009).
13. Goulon, M., Nouailhat, F., e Babinet, P. Irreversible coma. *Ann. Med. Interne.* 122, 479-486 (1971).
14. De Georgia, M. A. History of brain death as death: 1968 to the present. *J. Crit. Care.* 29, 673-678 (2014).
15. Shewmon, D. A. Evidence-based guideline update: Determining brain death in adults: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. 76, 308 (2011).
16. Wijdicks, E. F. M. *et al.* Evidence-based guideline update: determining brain death in adults: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 74, 1911-1918 (2010).
17. Resolução nº 1.480/97 do CFM, 1997.
18. Dosemeci, L. *et al.* Utility of transcranial doppler ultrasonography for confirmatory diagnosis of brain death: two sides of the coin. *Transplantation.* 77, 71-75 (2004).
19. Bartlett, J. B., Dredge, K., Dalglish, A. G. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer.* 4, 314-322 (2004).
20. Syntichaki, P., Tavernarakis, N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci.* 4, 672-684 (2003).
21. Faden, A. I., Demediuk, P., Panter, S. S., Vink, R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science.* 19, 798-800 (1989).
22. Rothman, S. M., Olney, J. W. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol.* 19, 105-111 (1986).
23. Chen, Z-Q, *et al.* The role of nitric oxide in stroke. *Med Gas Res.* 17, 194-203 (2017).

24. Hoane, M. R. *et al.* J Neurotrauma. 21, 163-174 (2004).
25. Garry, P. S. *et al.* The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment-from bench to bedside. Exp Neurol. 263, 235-243 (2015).
26. Charriaut-Marlangue, C. *et al.* Nitric oxide signaling in the brain: a new target for inhaled nitric oxide? Ann Neurol. 73, 442-448 (2013).
27. Ladecola, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. Trends Neurosci. 20, 132-139 (1997).
28. Srivastava, K., Bath, P. M W., Bayraktutan, U. Current therapeutic strategies to mitigate the eNOS dysfunction in ischaemic stroke. Cell Mol Neurobiol. 32, 319-336 (2012).
29. Wada, K., Chatzipanteli, K., Busto, R., Dietrich, W. D. Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat. J Neurosurg. 89, 807-818 (1998).
30. Clark, R. S. *et al.* Inducible nitric oxide synthase expression in cerebrovascular smooth muscle and neutrophils after traumatic brain injury in immature rats. Pediatr Res. 39, 784-790 (1996).
31. Stover, J. F. *et al.* Nitric oxide synthase inhibition with the antipterin VAS203 improves outcome in moderate and severe traumatic brain injury: a placebo-controlled randomized Phase IIa trial (NOSTRA). J Neurotrauma. 31, 1599-606 (2014).
32. Cooke, 2000. Does ADMA cause endothelial dysfunction? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20, 2032-2037 (2000).
33. Xiong, Y., Mahmood, A., Chopp, M. Current understanding of neuroinflammation after traumatic brain injury and cell-based therapeutic opportunities. Chin J Traumatol. 21, 37-151 (2018).
34. Watts, R. P., Thom, O., Fraser, J. F. Inflammatory signalling associated with brain dead organ donation: from brain injury to brain stem death and posttransplant ischaemia reperfusion injury. J Transplant. 2013, 521369 (2013).



35. Wang, C., C. et al. The aqueous extract from *Toona sinensis* leaves inhibits microglia-mediated Neuroinflammation. *Kaohsiung J Med Sci.* 30, 73-81 (2014).
36. Zhong, L., Simard, M. J., Huot, J. Endothelial microRNAs regulating the NF- $\kappa$ B pathway and cell adhesion molecules during inflammation. *FASEB J.* 32, 4070-4084 (2018).
37. Rothermel, A., L. et al. Endothelial cells present antigens in vivo. *BMC Immunol.* 16, 5 (2004).
38. Takata, F. et al. Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor- $\alpha$ , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro. *J Neuroinflammation.* 26, 106 (2011).
39. Shlosberg, D., Benifla, M., Kaufer, D. & Friedman, A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 393-403 (2010).
40. Das, M. et al. Lateral fluid percussion injury of the brain induces CCL20 inflammatory chemokine expression in rats. *J Neuroinflammation.* 8, 148 (2011).
41. Schmid, C., D. et al. Differential gene expression in LPS/IFN $\gamma$  activated microglia and macrophages: in vitro versus in vivo. *J Neurochem.* 109, 117-125 (2009).
42. Jong, E., K. et al. Vesicle-mediated transport and release of CCL21 in endangered neurons: a possible explanation for microglia activation remote from a primary lesion. *J Neurosci.* 17, 7548-7557 (2005).
43. Higashida, T. et al. The role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 114, 92-101 (2011).
44. Erickson, M., A., Nicolazzo, J., A., Banks, W., A. Commentary on the 2018 Named Series on blood-brain interfaces: Roles of neuroimmunomodulation in health and disease. *Brain Behav Immun.* 4, 3-6 2018).

45. Pun, P., B., L., Lu, J., Mochhala, S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic Res.* 43, 348-364 (2009).
46. You, Wan-Chun. *et al.* Activation of nuclear factor- $\kappa$ B in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage and its potential role in delayed brain injury. *PLoS One.* 8, e60290 (2013).
47. Lawrence, T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 1, 001651 (2009).
48. Israel, A. *et al.* TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF  $\kappa$ B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *EMBO J.* 8, 3793-3800 (1989).
49. Li, J. *et al.* Protective Effects of N-Acetylcysteine on the Liver of Brain-Dead Ba-Ma Mini Pig. *Transplant Proc.* 42, 195-199 (2010).
50. Zhang S. *et al.* Brain death affects the hepatic immunogenicity of pigs. *Transplant. Proc.* 40, 2159-2162 (2008).
51. Cozzi, E., Colpo, A., Silvestro, G. The mechanisms of rejection in solid organ transplantation. *Transfus Apher Sci.* 56, 498-505 (2017).
52. Varatharaj, A., Galea, I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun.* 60, 1-12 (2017).
53. Kiyatkin, E., A., Sharma, H., S. Permeability of the blood-brain barrier depends on brain temperature. *Neuroscience.* 161, 926-939 (2009).
54. Watson, P., Shirreffs, S., M., Maughan, R., J. Blood-brain barrier integrity may be threatened by exercise in a warm environment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288, 1689-1694 (2005).
55. Esposito, P. *et al.* Acute stress increases permeability of the blood-brain-barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res.* 888, 117-127 (2001).
56. Sharma, H., S., Ali, S., F. Alterations in blood-brain barrier function by morphine and methamphetamine. *Ann N Y Acad Sci.* 1074, 198-224 (2006).

57. Youn, S., T., Greer, D., M. Brain death and management of a potential organ donor in the intensive care unit. *Crit Care Clin.* 30, 813-831 (2014).
58. Ranasinghe, A., M., Bonser, R., S. Endocrine changes in brain death and transplantation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 25, 799-812 (2011).
59. Novitzky, D. *et al.* Hormonal therapy of the brain-dead organ donor: experimental and clinical studies. *Transplantation.* 82, 1396-1401 (2006).
60. Novitzky, D., Cooper, D., K., Morrell, D., Isaacs, S. Brain death, triiodothyronine depletion, and inhibition of oxidative phosphorylation: relevance to management of organ donors. *Transplant Proc.* 19, 4110-4111 (1987).
61. Dimopoulou, I. *et al.* High prevalence of decreased cortisol reserve in brain-dead potential organ donors. *Crit Care Med.* 31, 1113-1137 (2003).
62. Nair-Collins, M., Northrup, J., Olcese. Hypothalamic-Pituitary Function in Brain Death: A Review. *J Intensive Care Med.* 31, 41-50 (2014).
63. Franks, M., E., Macpherson, G., R., Figg, W., D. Thalidomide. *Lancet.* 363, 1802-1811 (2004).
64. Rajkumar, S., V. Thalidomide: tragic past and promising future. *Mayo Clin Proc.* 79, 899-903 (2004).
65. Mori, T. *et al.* Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. *Scientific Reports.* 8, 1294 (2018).
66. Leandro, A., J., Santos, F., L. History of Thalidomide in Brazil based on the print media (1959-1962). *Saúde Soc São Paulo.* 24, 991-1005 (2015).
67. Matthews, S., J., McCoy, C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clin Ther.* 25,342-95 (2003).

68. Tansey, E., M. Dark remedy: The impact of thalidomide and its revival as a vital medicine. *N Engl J Med.* 345, 226-227 (2001).
69. Clark, T., E., Edom, N., Larson, J., Lindsey, L., J. Thalidomid® (Thalidomide) Capsules. A review of the first 18 months of spontaneous postmarketing adverse event surveillance, including off-label prescribing. *Drug Safety.* 24, 87-117 (2001).
70. [Theguardian.com/international](https://www.theguardian.com/international) [home page in the internet]. London. Thalidomide: how men who blighted lives of thousands evaded justice, c2014 [citado 4 set. de 2021]. Disponível em <https://www.theguardian.com/international>.
71. Ingalls, T., H. et al. Thalidomide embryopathy in hybrid rabbits. *N Engl J Med.* 27, 441-444 (1964).
72. [Edition.cnn.com/world](https://edition.cnn.com/world) [home page in the internet]. New Jersey. Photos: History of Thalidomide, c2012 [citado 5 set. de 2021]. Disponível em <https://edition.cnn.com/2012/09/01/world/gallery/thalidomide-history/index.html>
73. Sheshkin, J. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. *Clin Pharmacol Ther.* 6, 303-306 (1965).
74. World Health Organization, 1977.
75. Hellmann, K., Duke, D., I., Tucker, D., F. Prolongation of skin homograft survival by thalidomide. *Br Med J.* 2, 687-689, 1965.
76. Chen, M. et al. Thalidomide ameliorates rosacea-like skin inflammation and suppresses NF- $\kappa$ B activation in keratinocytes. *Biomed. Pharmacother.* 116, 109011 (2019).
77. Fourcade, C. et al. Thalidomide in the treatment of immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV patients with neurological tuberculosis. *AIDS Patient Care STDS.* 28, 567-569 (2014).
78. Kumar, S., Anderson, K., C. Drug insight: thalidomide as a treatment for multiple myeloma. *Nat Clin Pract Oncol.* 2, 262-270 (2005).
79. Li, Y. et al. Thalidomide combined with short-term low-dose glucocorticoid therapy for the treatment of severe COVID-19: A case-series study. *Int J Infect Dis.* 103, 507-513 (2021).

80. Khalil, A., Kamar, A., Nemer, G. Thalidomide-Revisited: Are COVID-19 Patients Going to Be the Latest Victims of Yet Another Theoretical Drug-Repurposing? *Front Immunol.* 11,1248 (2020).
81. Santana, A., C. *et al.* Thalidomide suppresses inflammation in adenine-induced CKD with uraemia in mice. *Nephrol Dial Transplant.* 28, 1140-1149 (2013).
82. Vallet, S. *et al.* Thalidomide and lenalidomide: Mechanism-based potential drug combinations. *Leuk Lymphoma.* 49, 1238-1245 (2008).
83. Sampaio, E. P. *et al.* The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J. Infect. Dis.* 168, 408-414 (1993).
84. Moreira, A., L. *et al.* Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med.* 177, 1675-1680 (1993).
85. Zhu, H. *et al.* Anti-Inflammatory Effect of Thalidomide on H1N1 Influenza Virus-Induced Pulmonary Injury in Mice. *Inflammation.* 37, 2091-298 (2014).
86. Gareus, R. *et al.* Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. *Cell Metab.* 8, 372-383 (2008).
87. Tabary, O. *et al.* Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Signal.* 18, 652-660 (2006).
88. Luedde, T., Schwabe, R., F. NF-κB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 8, 108-118 (2011).
89. Keifer, J. A., Guttridge, D. C., Ashburner, B. P. & Baldwin, JrA. Inhibition of NF-κB activity by thalidomide through suppression of IκB Kinase activity. *J. Biol. Chem.* 276, 22382-22387 (2001).
90. Molinero, L. L. *et al.* NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 173, 5583-5590 (2004).

91. Jost, P. J., Ruland, J. Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *109*, 277-2707 (2007).
92. Ghosh, S., Hayden, M. S. New regulators of NF-kappa B in inflammation. *11*, 837-848 (2008).
93. Shi, Q., Chen, L. Cereblon: A Protein Crucial to the Multiple Functions of Immunomodulatory Drugs as well as Cell Metabolism and Disease Generation. *J Immunol Res.* 2017, 9130608 (2017).
94. Ito, T. *et al.* Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*, 327, 1345-1350 (2010).
95. Kolkert, J., L., P. *et al.* The gradual onset brain death model: a relevant model to study organ donation and its consequences on the outcome after transplantation. *Lab Anim.* 41, 363-371 (2007).
96. Zhang, H. *et al.* Renal-protective effect of thalidomide in streptozotocin-induced diabetic rats through anti-inflammatory pathway. *Drug Des Devel Ther.* 12, 89-98 (2018).
97. Chong, Lee-Won. *et al.* Anti-fibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci.* 13, 403-408 (2006).
98. Santana AC. 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.
99. Rong, Y., Baudry, M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. *J Neurochem.* 67, 662-668 (1996).
100. Power, B., M., Heerden, P., V., V. The physiological changes associated with brain death current concepts and implications for treatment of the brain dead organ donor. *Anaesth Intensive Care.* 23, 26-36, 1995.
101. Cooper, D., K., Novitzky, D., Wicomb, W., N. The pathophysiological effects of brain death on potential donor organs, with particular reference to the heart. *Ann R Coll Surg Engl.* 71, 261-266 (1989).

102. Zhang, Q., Lenardo, M., J., Baltimore, D. 30 Years of NF- $\kappa$ B: A blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell*. 168, 37-57 (2017).
103. Park, S. J. *et al.* Thalidomide as a potent inhibitor of neointimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 885-891(2004).
104. Essien, E., O. *et al.* Physiologic Features of Brain Death. *Am Surg.* 83, 850-854 (2017).
105. Tuttle-Newhall, E., J., Collins, B., H., Kuo, P., C., Schoeder, R. Organ donation and treatment of the multi-organ donor. *Curr Probl Surg.* 40, 266-310 (2003).
106. Das, M., Mohapatra, S., Mohapatra, S., S. New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury. *J Neuroinflammation.* 2, 236 (2012).
107. Fernández-Martínez, E. *et al.* Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp. Toxicol. Pathol.* 58, 49-58 (2006).
108. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3, 23-35 (2003).
109. Schett, G. Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. *Rheumatology (Oxford).* 57, 43-50 (2018).
110. Mandrekar, P. *et al.* An essential role for monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholic liver injury: regulation of proinflammatory cytokines and hepatic steatosis in mice. *Hepatology.* 54, 2185-2197 (2011).
111. Liu, J., Cao, X. Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. *Cell Mol Immunol.* 13, 711-721 (2016).
112. Keller, C. W. *et al.* TNF-alpha induces macroautophagy and regulates MHC class II expression in human skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 286, 3970-3980 (2011).

113. Kittur, D. S. *et al.* Locally derived cytokines and upregulation of MHC class II genes in allografts. *J. Heart. Lung. Transplant.* 8, 882-889 (2002).