



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DO CORAÇÃO - HCFMUSP
DEPARTAMENTO DE CARDIOPNEUMOLOGIA

VANESSA SANA VILELA

Avaliação inflamatória de pulmões submetidos ao tratamento de talidomida em
modelo experimental de morte encefálica

São Paulo

2023

VANESSA SANA VILELA

**Avaliação inflamatória de pulmões submetidos ao tratamento de Talidomida
em modelo experimental de morte encefálica**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de Título
de Doutor em Ciências.

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Prof. Dr. Paulo M. Pêgo Fernandes.

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vilela, Vanessa Sana

Avaliação inflamatória de pulmões submetidos ao tratamento de talidomida em modelo experimental de morte encefálica / Vanessa Sana Vilela. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Paulo Manuel Pêgo Fernandes.

Descritores: 1.Morte encefálica 2.Transplante de pulmão 3.Inflamação 4.Talidomida 5.NF-Kappa B

USP/FM/DBD-002/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais, Sandra Cristina e Roberto, que sempre fizeram de tudo para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Muito obrigada por toda dedicação, carinho, paciência e apoio durante toda essa jornada, sem vocês nada disso seria possível. Essa conquista é para vocês!

Aos meus avós, Efisio e Leonilda, que junto aos meus pais me proporcionaram tudo que tenho hoje, vocês me ensinaram a ser uma pessoa honesta, justa, responsável, dedicada e, principalmente, ensinaram-me a nunca desistir. Muito obrigada por tudo!

Ao meu amor, Guilherme, eu só tenho a te agradecer por todo apoio ao longo dessa jornada, não foi fácil, mas você foi essencial para essa conquista.

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelos ensinamentos, paciência e dedicação. Obrigada pelo carinho e amor, sem isso eu não chegaria até aqui.

Ao meu amor, Guilherme, meu confidente. Obrigada por todo incentivo, conselhos e reflexões sobre a elaboração dessa tese!

Ao meu avô Efisio que, infelizmente, não está mais presente entre nós, mas tenho certeza que, de onde estiver, estará sempre olhando e torcendo por mim. O senhor sempre vibrou a cada conquista e esta não seria diferente. Todas as minhas conquistas são para o senhor! Eu te amo!

À minha avó Leonilda por todo amor, carinho e cuidado. A senhora é essencial em minha vida.

À minha prima, Juliana, pelo apoio ao longo de toda essa tese. Obrigada por sempre acreditar e se espelhar em mim.

Aos meus tios, Marcela e Walter, por todo apoio ao longo dessa jornada.

Aos meus avós, Dulce e Luiz, meus tios, tias, primos e primas, obrigada por todo aprendizado, por sempre acreditarem em mim e incentivarem-me a ir cada vez mais longe.

Às minhas amigas: Vitória Braga e Bianca Ventura por todos os conselhos e ajuda com a tese, por todo incentivo e por sempre acreditarem em mim! Amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo M. Pêgo Fernandes, obrigada pelo aprendizado e pela oportunidade de realizar este doutorado no Laboratório de Investigação Médica LIM61.

Às minhas colegas de pesquisa, Karina Andrighetti, Liliane Ruiz e Natalia Nepomuceno, muito obrigada pela ajuda desde a realização dos experimentos, até as dicas de escrita e apresentação da tese, dos conselhos e ensinamentos para vida.

Ao colega Aristides por todos os ensinamentos estatísticos, e por todo seu conhecimento na realização das análises. Você também foi fundamental para a realização dessa tese.

Aos colegas Paolo, Fernando, Vinícius, Jhonatan e Giovana, por todo ensinamento e auxílio nas realizações dos experimentos e análises. Juntos somos uma boa equipe.

Às amigas Bruna, Suelen, Anne e Tati por todo apoio, incentivo, paciência e conselhos ao longo desses anos. Obrigada pela amizade de vocês.

Aos funcionários da Divisão Experimental e Biotério: Lelê, Richard, Dario, Vicente, Hugo, Roberto, Pedro e Anderson por toda ajuda.

À equipe de pós-graduação, Neusa, Juliana, Sidney, Monica, Val e Luana do Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular. Obrigada pela ajuda com todos os formulários.

Muito obrigada!

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da sua publicação.

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.]. --3.ed. rev. ampl. mod. - - São Paulo: SIBi/USP, 2016. 100p.: il. -- (Cadernos de estudos; 9).

ISBN: 978-85-7314-056-9

DOI: 10.11606/9788573140569

CAPES – Bolsa de doutorado

RESUMO

Vilela VS. Avaliação inflamatória de pulmões submetidos ao tratamento de talidomida em modelo experimental de morte encefálica [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

INTRODUÇÃO: O transplante pulmonar é uma alternativa terapêutica amplamente utilizada no tratamento de doenças pulmonares em estágio avançado e tem como maior fonte os doadores em morte encefálica. A morte encefálica desencadeia alterações hemodinâmicas, hormonais, metabólicas e inflamatórias. Dentre as alterações inflamatórias encontradas, destaca-se a ativação do fator de transcrição NF- κ B, responsável por regular a expressão dos genes que controlam a morte celular programada, adesão celular, proliferação e o remodelamento tecidual, além de estimular a produção de citocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β . A Talidomida se insere nesse contexto, pois é um fármaco com atividade antiproliferativa, antifibrótica e anti-inflamatória pouco explorada na literatura sobre transplante. **OBJETIVOS:** Avaliar o efeito da Talidomida sobre a inflamação pulmonar de doadores em modelo experimental de morte encefálica. **MÉTODOS:** Vinte e quatro ratos foram divididos em três grupos: CONTROLE (CTR n=8), Morte Encefálica (ME n=8) e Morte Encefálica + Talidomida (TLD n=8). Após anestesia, intubação e traqueostomia, os animais dos grupos ME e TLD foram submetidos à cateterização de artéria e veia femoral, seguido de indução da morte encefálica e tratamento via intraperitoneal com solução salina ou Talidomida (50 mg/Kg), respectivamente. Os animais foram monitorados por 360 minutos. Em todos os grupos foram feitas coletas de sangue, e extração do bloco cardiopulmonar para posterior análise. **RESULTADOS:** Avaliação hemodinâmica evidenciou pico hipertensivo após a morte encefálica, seguida de hipotensão sem diferença entre os grupos ME e TLD ($p > 0.05$). Foi observado edema pulmonar nos grupos submetidos a ME (ME $p = 0,0083$ e TLD $p = 0,0092$). O marcador IL-6 apresentou níveis elevados nos grupos ME e TLD comparados ao CTR ($p = 0,0067$ e $p = 0,0137$, respectivamente), o TNF- α apresentou um aumento no grupo ME quando comparado ao grupo CTR e TLD ($p = 0,0152$ e $p = 0,0495$ respectivamente), o IL-1 β foi maior no grupo ME ($p = < 0,0001$) e TLD ($p = 0,0009$) em comparação ao CTR e foi maior no grupo ME quando comparado ao grupo TLD ($p = 0,0174$). Na análise de imuno-histoquímica, o marcador NF- κ B foi possível observar um aumento no grupo ME quando comparado ao grupo CTR e TLD ($p = 0.0006$ e $p = 0.0005$ respectivamente). Foi observado aumento de SOD no grupo ME comparado ao CTR ($p = 0.0340$), MDA no grupo CTR comparado ao grupo TLD ($p = 0,0333$) e MPO no grupo TLD quando comparado ao CTR ($p = 0,0166$). Os grupos submetidos a ME apresentaram uma queda de leucócitos na circulação sistêmica ($p = < 0.0001$) e aumento de leucócitos em lâmina de tecido pulmonar ($p = < 0,0001$). Na análise de neutrófilos sistêmicos, foi observado um aumento tanto o grupo ME, quanto o grupo TLD ($p = < 0,0001$) ao longo do tempo, e também quando comparados ao grupo CTR, no momento final (ME $p = 0,0001$ e TLD $p = 0,0070$). **CONCLUSÃO:** A morte encefálica promove inflamação pulmonar aguda significativa, formação de edema pulmonar e leucopenia sistêmica. Com relação à inflamação, a Talidomida se mostrou ser eficaz na redução dos níveis de TNF- α , IL-1 β e NF- κ B que são precursores do processo inflamatório.

Palavras-chave: Morte encefálica. Transplante de pulmão. Inflamação. Talidomida. NF-Kappa B.

ABSTRACT

ABSTRACT

Vilela VS. Inflammatory assessment of lungs subjected to thalidomide treatment in an experimental model of brain death [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

INTRODUCTION: Lung transplantation is a widely used therapeutic alternative for advanced-stage lung diseases, with the primary source of donor organs being individuals with brain death. Brain death triggers hemodynamic, hormonal, metabolic, and inflammatory changes. Among the inflammatory changes observed, the activation of the NF- κ B transcription factor stands out, which regulates the expression of genes controlling programmed cell death, cell adhesion, proliferation, tissue remodeling, and stimulates the production of cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-1 β . Thalidomide is relevant in this context as it is a drug with antiproliferative, antifibrotic, and relatively unexplored anti-inflammatory properties in the literature on transplantation.

OBJECTIVES: To evaluate the effect of thalidomide on lung inflammation in a experimental model of brain death donors.

METHODS: Twenty-four rats were divided into three groups: CONTROL (CTR n=8), Brain Death (BD n=8), and Brain Death + Thalidomide (TLD n=8). After anesthesia, intubation, and tracheostomy, animals in the BD and TLD groups underwent femoral artery and vein catheterization, followed by induction of brain death and intraperitoneal treatment with saline or thalidomide (50 mg/kg), respectively. The animals were monitored for 360 minutes. Blood samples were collected, and the cardiopulmonary block was extracted for subsequent analysis in all groups.

RESULTS: Hemodynamic evaluation revealed a hypertensive peak after brain death, followed by hypotension with no difference between the BD and TLD groups ($p > 0.05$). Pulmonary edema was observed in the BD groups (BD $p = 0.0083$ and TLD $p = 0.0092$). The IL-6 marker showed elevated levels in the BD and TLD groups compared to the CTR ($p = 0.0067$ and $p = 0.0137$, respectively), TNF- α showed an increase in the BD group compared to the CTR and TLD groups ($p = 0.0152$ and $p = 0.0495$, respectively), IL-1 β was higher in the BD group ($p < 0.0001$) and TLD group ($p = 0.0009$) compared to the CTR, and it was higher in the BD group when compared to the TLD group ($p = 0.0174$). In the immunohistochemical analysis, the NF- κ B marker showed an increase in the BD group compared to the CTR and TLD groups ($p = 0.0006$ and $p = 0.0005$, respectively). SOD levels were observed to increase in the BD group compared to the CTR ($p = 0.0340$), MDA in the CTR group compared to the TLD group ($p = 0.0333$), and MPO in the TLD group when compared to the CTR ($p = 0.0166$). The groups subjected to brain death showed a decrease in circulating leukocytes ($p < 0.0001$) and an increase in leukocytes in lung tissue slides ($p < 0.0001$). In the systemic neutrophil analysis over time, an increase was observed in both the BD and TLD groups ($p < 0.0001$) and also when compared to the CTR group, at the final moment (BD $p = 0.0001$ and TLD $p = 0.0070$).

CONCLUSION: Brain death induces significant acute lung inflammation, pulmonary edema formation, and systemic leukopenia. Regarding inflammation, thalidomide proved to be effective in reducing TNF- α , IL-1 β , and NF- κ B levels, which are precursors of the inflammatory process.

Keywords: Brain death. Lung transplantation. Inflammation. Thalidomide. NF-Kappa B.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Distribuição de diagnóstico de receptores adultos por local e ano.....	39
Figura 02: Reflexo de Cushing.....	41
Figura 03: Mecanismos pelos quais a morte encefálica pode induzir uma resposta inflamatória sistêmica.....	42
Figura 04: Vias de sinalização do NF- κ B.....	45
Figura 05: Estrutura da Talidomida.....	46
Figura 06: Desenho experimental.....	51
Figura 07: Imunohistoquímica para NF- κ B em lâmina de tecido pulmonar de ratos..	66

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01: Evolução no número de transplantes realizados de 1988 a 2017, reportados ao Registro de Transplante ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation)	34
Gráfico 02: Número absoluto de transplantes (anual).....	37
Gráfico 03: Avaliação da pressão arterial média ao longo do tempo.....	60
Gráfico 04: Peso úmido/peso seco.....	63
Gráfico 05: avaliação da IL – 6 em amostra de homogenato pulmonar de ratos	63
Gráfico 06: avaliação do Fator de Necrose Tumoral – α em amostra de homogenato pulmonar de ratos	64
Gráfico 07: Avaliação da Interleucina - 1 β em amostra de homogenato pulmonar de ratos.....	65
Gráfico 08: Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no homogenato pulmonar de ratos.....	65
Gráfico 09: Avaliação do marcador NF- κ B em lâmina de tecido pulmonar de ratos.....	66
Gráfico 10: Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em homogenato pulmonar de ratos.....	67
Gráfico 11: Concentração de Malondialdeído (MDA) em homogenato pulmonar de ratos.....	68
Gráfico 12: Contagem Total de Leucócitos em lâmina de tecido pulmonar.....	70
Gráfico 13: Contagem Total de Leucócitos em lâmina de sangue periférico no momento final do experimento.....	70
Gráfico 14: Número total de leucócitos avaliados ao longo do tempo, em amostra de sangue periférico.....	71
Gráfico 15: Contagem de neutrófilos inicial e final em amostra de sangue periférico pela técnica de extensão sanguínea.....	72
Gráfico 16: Avaliação dos níveis de neutrófilo final em amostra de sangue.....	72
Gráfico 17: Avaliação da pressão arterial média ao longo do experimento dos grupos submetidos ME e tratados via gavagem.....	82
Gráfico 18: Análise de Multiplex em amostra de tecido pulmonar para marcadores inflamatórios.....	83

Gráfico 19: Análise de ELISA em amostra de soro para marcadores inflamatórios.....	84
Gráfico 20: Análise de ELISA em amostra de LBA para marcadores inflamatórios.....	85
Gráfico 21: Análise de Espécies Reativas de Oxigênio em amostra de tecido pulmonar para marcadores inflamatórios.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Lista dos critérios clínicos utilizados para a seleção dos doadores de pulmão ideais.....	38
Tabela 02: Lista dos critérios clínicos estendidos utilizados para a seleção dos doadores de pulmão.....	40
Tabela 03: Avaliação da mecânica ventilatória ao final do experimento.....	61
Tabela 04: Avaliação dos parâmetros gasométricos e metabólicos no momento final em amostra de sangue arterial.....	62
Tabela 05: Avaliação da Catalase (CAT) e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em amostra de homogenato pulmonar de ratos.....	68
Tabela 06: Avaliação da área de edema perivascular e score de lesão pulmonar em amostra de tecido pulmonar de ratos.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

η - Histeresividade

ABTO - Associação Brasileira de Transplante de Órgãos

BE - Excesso de Base

CAT - Catalase

CEUA - Comissão de Ética no uso de Animais

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CI - Capacidade Inspiratória

Crs - Complacência do Sistema Respiratório

Cst - Complacência Estática

CTR - Controle

DPE - Disfunção Primária do Enxerto

DPOC - Doença Pulmonar Crônica

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

Ers - Elastância do Sistema Respiratório

FC - Fibrose Cística

FPI - Fibrose Pulmonar Idiopática

G - Resistência Tecidual

H - Elastância Tecidual

HCO₃⁻ - Bicarbonato

Hct - Hematócrito

HE - Hematoxilina e eosina

IL- Interleucina

IO - Índice de Oxigenação

ISHLT - International Society for Heart & Lung Transplantation

LIM - Laboratório de Investigação Médica

MDA - Malondialdeído

ME - Morte Encefálica

MPO - Mieloperoxidase

MV - Mecânica Ventilatória

NF-κB - Nuclear Factor kappa B

NIK - NF-κB inducing kinase

PAM - Pressão Arterial Média

PBS - Phosphate Buffered Saline

PCO₂ - Pressão Arterial de Dióxido de Carbono

pH - Potencial Hidrogeniônico

PIP - Pressão Inspiratória de Pico

PO₂ - Pressão Arterial de Oxigênio

RN - Resistência Newtoniana

Rrs - Resistência do Sistema Respiratório

SatO₂ - Saturação de Oxigênio

SOD - Superóxido Dismutase

TBARS - Ácido Tiobarbitúrico

TLD - Talidomida

TNF-α - Tumor Necrosis Factor alpha

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo Principal.....	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	32
3.1 Transplante	32
3.1.1 Histórico dos Transplantes	32
3.1.1.1 Imunossupressão	33
3.1.1.1.1 Transplante Pulmonar	35
a) Doação de Órgãos	37
3.2 Morte Encefálica	40
3.3 Fator Nuclear Kappa B (NF-κB).....	43
3.4 Talidomida.....	46
4 MÉTODOS.....	50
4.1 Material e Métodos	50
4.1.1 Grupos experimentais	50
4.2 Procedimento Cirúrgico.....	51
4.2.1 Anestesia.....	51
4.1.1.2 Intervenção cirúrgica	51
4.1.1.1.2 Modelo experimental de morte encefálica	52
a) Extração do bloco cardiopulmonar	52
4.3 Análise Gasométrica e Metabólica.....	53
4.4 Análise da Mecânica Pulmonar	53
4.1.4 Medida dos parâmetros do modelo de fase constante	53
4.1.1.4 Curva pressão-volume	54
4.1.1.1.4 Manobras ventilatórias	54
4.5 Análise da razão Peso úmido/Peso seco	54
4.6 Dosagem De Citocinas No Tecido Pulmonar.....	54
4.7 Análise de Imunohistoquímica no Tecido Pulmonar.....	55
4.8 Marcadores Redoxes no Homogenato Pulmonar.....	56
4.9 Avaliação Histopatológica Pulmonar.....	56
4.10 Leucograma.....	57
4.11 Análises Estatísticas.....	58

5 RESULTADOS.....	60
5.1 Modelo de Morte Encefálica.....	60
5.1.1 Parâmetro hemodinâmico.....	60
5.1.1.1 Mecânica pulmonar	61
5.1.1.1.1 Parâmetros gasométricos e metabólicos em amostra de sangue arterial ..	61
a) Peso úmido x peso seco	62
b) Marcadores inflamatórios	63
c) Imunohistoquímica	66
d) Marcadores redox e dano oxidativo	67
e) Análise histológica	69
f) Leucograma	70
g) Contagem de neutrófilo em amostra de sangue periférico.....	71
6 DISCUSSÃO.....	74
7 CONCLUSÃO.....	80
ANEXOS.....	82
Resultados apresentados No Exame De Qualificação.....	82
Animais submetidos ao tratamento por gavagem	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O transplante pulmonar é a principal alternativa de tratamento para pacientes com doenças pulmonares crônicas em estágio terminal. No entanto, apesar dos avanços na área médica, ainda há escassez de pulmões adequados para doação. A captação de órgãos tem origem, principalmente, a partir de doadores falecidos em morte encefálica (ME). Contudo, o processo de ME desencadeia complicações hemodinâmicas, hormonais e um intenso processo inflamatório que podem prejudicar a função e qualidade do órgão, impactando a sobrevida do transplantado (1-4).

A ME se inicia com o aumento da pressão intracraniana, levando à perda total e irreversível das funções cerebrais. O pulmão está entre os órgãos mais vulneráveis aos efeitos deletérios causados pela ME, uma vez que o aumento da produção de fatores pró-inflamatórios favorece a indução de lesão pulmonar aguda e, portanto, pode aumentar a incidência de disfunção primária do enxerto (3-7).

Infelizmente, a sobrevida pós-transplante pulmonar também é baixa, apresentando altos índices de mortalidade relacionados à disfunção primária do enxerto (DPE), rejeição aguda, disfunção crônica do enxerto, infecções e complicações cirúrgicas (8).

Na prática clínica, as principais causas que levam a um quadro de traumatismo cranioencefálico variam entre acidentes de trânsito, quedas e agressões. O trauma encefálico seguido de ME resulta em uma parada irreversível das funções do encéfalo (9).

A ME decorrente de trauma cranioencefálico, hemorragia intracraniana ou infarto, tem início com o aumento progressivo da pressão intracraniana associado ao aumento da massa encefálica, com comprometimento do retorno venoso. Ela é marcada pelo Reflexo de Cushing, uma vez que apresenta um pico hipertensivo imediato decorrente da liberação de adrenalina, noradrenalina, e consequente bradicardia. Apresenta uma alta instabilidade hemodinâmica devido à rápida liberação de catecolaminas (também chamada de tempestade autonômica), gerando hipertensão, taquicardia e aumento da resistência sistêmica. Este evento promove um aumento da liberação de mediadores inflamatórios circulantes, além de alterações metabólicas e hormonais, como a queda de ADH, insulina, T3 e T4. Diante de um quadro clínico como este, o paciente (potencial doador) entrará em um estado de

diabetes insípido. Essa redução do ADH gera uma importante desidratação que irá comprometer a hemodinâmica e a perfusão (5,6).

A fase hipertensiva é seguida por um processo de hipotensão arterial compensatória, devido à dilatação dos vasos, com formação de áreas isquêmicas, o que diminui a perfusão e oxigenação nos tecidos e aumenta a expressão de mediadores inflamatórios, moléculas de adesão e infiltração de células inflamatórias em diversos órgãos, comprometendo sua funcionalidade (5,6).

Dentre as diversas alterações imunológicas encontradas durante o período da ME, destaca-se a ativação do fator de transcrição NF- κ B. A ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) contribui para a progressão da rejeição do transplante, pois estimula a expressão de importantes genes com atividade inflamatória. Estudos experimentais demonstraram que durante o processo de ME há uma liberação sistêmica de citocinas como: interleucina - 1 beta (IL-1 β), interleucina - 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O aumento da expressão destas citocinas no doador pode contribuir para a deterioração progressiva da função do enxerto associada a alterações morfológicas vasculares e intersticiais, na reperfusão do órgão. Essa condição no doador está relacionada à disfunção primária do enxerto pulmonar pós transplante (10,11).

A Talidomida é um agente sintético derivado do ácido glutâmico e se insere neste contexto como uma possível intervenção para o controle e/ou redução da inflamação, pois apresenta importantes propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, sendo efetivamente utilizada para o tratamento de pacientes com distúrbios inflamatórios, uma vez que atua suprimindo o NF- κ B ao mesmo tempo em que estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina - 10 (IL-10) (12-14). Nesse contexto, protocolos precisos relacionados ao cuidado do doador aumentam a disponibilidade e qualidade do órgão ofertado.

Considerando a importância dos cuidados com o doador e os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores da Talidomida, não há na literatura trabalhos que relacionem o tratamento de doadores de pulmão ao uso desse fármaco. O presente trabalho se insere neste contexto, pois avalia e compara o efeito da Talidomida sobre a inflamação pulmonar de doadores em modelo experimental de ME.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo:

2.1 Objetivo Principal

Analisar e comparar o efeito da Talidomida na inflamação pulmonar em modelo experimental de doador em morte encefálica.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar as possíveis alterações presentes na histopatologia pulmonar.

Investigar os mediadores inflamatórios presentes na concentração proteica do tecido pulmonar.

Analisar o perfil oxidativo presente no tecido pulmonar.

Estudar os efeitos da Talidomida sobre as propriedades mecânicas do sistema respiratório, gasométricas e metabólicas do animal.

Avaliar o efeito protetor da Talidomida na análise de imunohistoquímica.

Avaliar as alterações presentes na análise da contagem total de leucócitos em amostra de tecido pulmonar e sangue periférico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Transplante

O transplante de órgãos sólidos se consolidou como uma alternativa terapêutica indispensável para o tratamento de doenças crônicas de caráter irreversível e em estágio final com o intuito de proporcionar melhora na qualidade de vida, saúde e bem-estar ao paciente, além de aumentar sua expectativa de vida (15).

No cenário mundial, a trajetória dos transplantes é marcada por fases de grande progresso e estagnação, apresentando uma evolução incontestável em um curto período. Após inúmeras tentativas, tanto experimentais, quanto clínicas, o primeiro transplante realizado com sucesso cirúrgico e imunológico aconteceu no ano de 1954, e foi realizado pelo médico cirurgião Dr. Joseph Murray (16).

Diversos achados surgiram na área da medicina no decorrer dos anos, bem como na evolução do transplante, que ganhou destaque a partir do século XX como consequência das descobertas desenvolvidas pelos cirurgiões Aléxis Carrel (ganhador do Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 1912) e Charles C. Guthrie. Alexis Carrel fundou as bases metodológicas para o transplante de órgãos sólidos, ao descrever diferentes técnicas de anastomoses para vasos sanguíneos. Seus achados permitiram o início de um século de descobertas e avanços para a implantação de enxertos pulmonares. Posteriormente, com a descoberta da ciclosporina na década de 1970, o manejo da imunossupressão também contribuiu para o grande avanço na realização dos transplantes (17-19).

3.1.1 Histórico dos Transplantes

A realização do transplante de órgão sólido post mortem para implante em um receptor vivo foi um dos avanços terapêuticos mais notáveis da medicina durante o século XX, tendo como fase inicial pesquisas experimentais envolvendo modelo animal. Os primeiros transplantes apresentavam resultados insatisfatórios e com baixa sobrevida, mas após inúmeros estudos e tentativas, o médico cirurgião Joseph Murray realizou um dos primeiros transplantes de órgãos bem-sucedidos da época. Foi um transplante renal, realizado nos Estados Unidos no ano de 1954. A cirurgia ocorreu entre dois irmãos gêmeos idênticos (Ronald e Richard Herrick) e o receptor sobreviveu por oito anos. Por sua grande conquista, Joseph Murray ganhou o Prêmio Nobel de Medicina no ano de 1990 (20,21).

Outra conquista histórica que marcou o cenário dos transplantes foi a realização do primeiro transplante cardíaco homólogo ortotópico realizado na África do Sul, pelo médico cirurgião Christian Barnard, no ano de 1967. Ao contrário do transplante realizado por Joseph Murray, este foi feito entre um homem (receptor) de 54 anos e uma mulher (doadora) de 24 anos com diagnóstico de ME (19, 22).

Com o passar dos anos, novos transplantes foram relatados, no entanto, a rejeição do enxerto ainda limitava os resultados, uma vez que ela era responsável por diminuir a sobrevida dos receptores. O transplante realizado por Christian Barnard estimulou novos estudos envolvendo as reações de rejeição do enxerto, dado que seu transplante foi entre indivíduos heterogêneos (19).

Outro marco essencial na era dos transplantes ocorreu entre as décadas de 60/80 com a descoberta dos medicamentos imunossupressores responsáveis por reduzir os efeitos da rejeição do enxerto. Inicialmente, eles surgiram com a descoberta da azatioprina (utilizada no primeiro transplante bem-sucedido realizado por Barnard), entretanto, sua taxa de sucesso não era tão expressiva quando comparada aos imunossupressores que surgiram nos anos seguintes como a ciclosporina, que foi desenvolvida na década de 70 como um fármaco específico que age contra a produção de células T, tornando a imunossupressão mais representativa, sendo responsável por aumentar 75% a 80% da sobrevida dos pacientes operados após transplantes cardíacos (19, 20, 22).

3.1.1.1 Imunossupressão

A rejeição do enxerto em decorrência da resposta imune do receptor ao tecido doado ainda constitui um grande desafio para o sucesso do transplante. Nesse contexto, Paul Ehrlich e Aléxis Carrel foram os primeiros cientistas que, por meio de seus estudos, evidenciaram e caracterizaram uma série de alterações biológicas no processo de rejeição pós-transplante (22,23).

Nesse sentido, o surgimento dos imunossupressores foi um marco importante para o sucesso do transplante de órgãos, impactando diretamente para um aumento na sobrevida de pacientes (22,23).

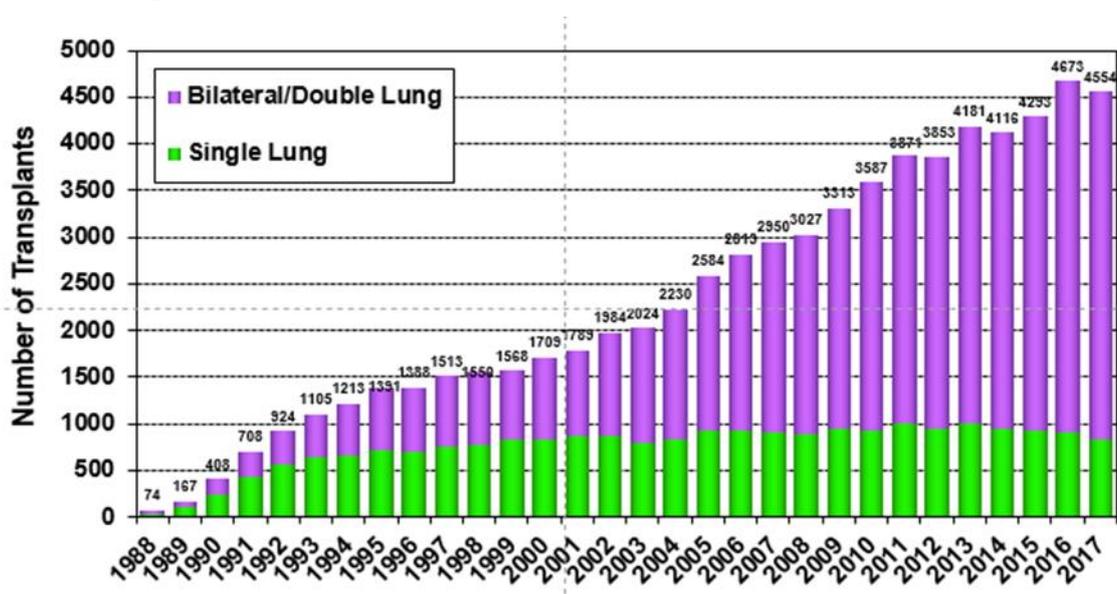
A ciclosporina foi descoberta no início da década de 1970 pela equipe liderada pelo microbiologista e imunologista Jean Borel, pela empresa farmacêutica Sandoz. Ela foi fundamental neste contexto e contribuiu de maneira significativa para o sucesso dos protocolos de imunossupressão na década de 80. O composto foi identificado a

partir de culturas contendo os fungos *Tolypocladium inflatum* e *Cylindrocarpon lucidum* (22- 24).

A principal vantagem da ciclosporina é sua capacidade de inibir, especificamente e reversivelmente, a calcineurina fosfata que desempenha um papel fundamental na fase inicial da ativação de células T, evitando a rejeição aguda devido ação que estas células desempenham na resposta autoimune. A potência e a especificidade do efeito da ciclosporina no sistema imunológico resultaram em uma melhora significativa nos desfechos clínicos após o transplante de coração e pulmão (23, 24).

O gráfico 01 evidencia o aumento expressivo no número de transplantes unilateral e bilateral realizados após a descoberta e aprimoramento dos protocolos de imunossupressão. Este gráfico inclui apenas os transplantes de pulmão reportados ao Registro de Transplante ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation). Observe que durante o período de 1988 à 1998, com a ampliação dos protocolos e manejo de imunossupressão, o número de procedimentos realizados passou de 74 para 1559/ano.

Gráfico 1: Evolução no número de transplantes realizados de 1988 a 2017, reportados ao Registro de Transplante ISHLT.



Fonte: <https://www.isHLT.org>

A principal limitação da imunossupressão à base de ciclosporina tem sido a nefrotoxicidade, que tende a ser progressiva e é a causa de morbidade em receptores

de transplantes não renais. Várias medidas estão sendo adotadas para amenizar esse dano colateral. O uso da ciclosporina associado a outros agentes imunossupressores permitiu que doses mais baixas e níveis sanguíneos alvo fossem usados, no entanto, sua especificidade imunológica é reduzida (24,25).

A combinação da ciclosporina com corticosteroides possibilitou que doses mais baixas de ciclosporina fossem usadas. Porém, o uso contínuo dos corticosteroides gerou grande preocupação devido aos seus efeitos. Em um segundo momento, foi feita a combinação da ciclosporina com azatioprina como forma de minimizar e, eventualmente, eliminar o efeito dos corticosteroides. A chamada "terapia tripla" se tornou uma prática imunossupressora muito utilizada. Era administrada por meio de doses mais baixas de ciclosporina, corticosteroides e azatioprina (24,25).

Novos agentes surgiram com o passar dos anos. O micofenolato mofetil tem se mostrado um componente eficaz do regime imunossupressor. O tacrolimus também se destacou como um agente muito interessante e extremamente poderoso. Após a administração de doses minuciosas, ele inibe a proliferação e diferenciação de células T-citotóxicas, no entanto, seu modo de ação se mostra muito semelhante a ciclosporina, e o efeito colateral nefrotóxico dos inibidores calcineurinos tem sido motivo de preocupação. Um macrolídeo quimicamente semelhante ao tacrolimus, mas com uma forma diferente de ação chamada sirolimus, não é nefrotóxico e pode ser um valioso imunossupressor em receptores de todos os aloenxertos (25).

Atualmente, uma série de imunossupressores são utilizados na prática clínica, eles são escolhidos de acordo com a necessidade do paciente transplantado.

3.1.1.1.1 Transplante Pulmonar

Em 1963, ocorreu o primeiro transplante pulmonar em humano já descrito, a cirurgia foi realizada pelo médico cirurgião Dr. James Hardy, que possuía ampla experiência no transplante em modelo canino, servindo de estímulo para a utilização da técnica em humanos. O transplante unilateral esquerdo foi realizado em um homem de 58 anos portador de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e carcinoma espinocelular do pulmão esquerdo. O paciente sobreviveu por 18 dias e foi a óbito por insuficiência renal progressiva (26).

O sucesso da técnica foi alcançado vinte anos depois, já na era dos imunossupressores, em especial a ciclosporina. A equipe da Universidade de Stanford realizou o primeiro transplante de coração-pulmão em uma mulher de 45 anos

portadora de hipertensão pulmonar primária. A paciente apresentou uma sobrevida de mais de cinco anos, o que motivou novos grupos a realizar este tipo de procedimento (27).

A equipe de transplante de Toronto (Toronto Lung Transplant Group), liderada pelo Dr. Joel Cooper, realizou em 1983 o primeiro transplante unilateral em um homem de 53 anos portador de fibrose pulmonar idiopática. O paciente apresentou uma sobrevida de mais de seis anos. O grupo de Toronto também foi responsável por realizar o primeiro transplante pulmonar bilateral em bloco, essa técnica foi executada com auxílio de circulação extracorpórea e apresentava uma alta incidência de complicações. Em 1986, foi realizado o primeiro transplante duplo de pulmões (sem transplantar o coração junto) e só em 1989 foi introduzida a técnica do transplante pulmonar bilateral sequencial (28, 29).

Diante desse quadro, a técnica de transplante pulmonar bilateral sequencial foi introduzida na prática clínica, e consiste na implantação sequencial de cada pulmão, esta técnica é a mais utilizada por apresentar uma melhor cicatrização e menor desvascularização que as técnicas anteriores (1,30).

Atualmente, são realizadas cinco modalidades diferentes de transplante pulmonar: a unilateral, a bilateral em bloco, a bilateral sequencial, a cardiopulmonar e a lobar (inter-vivos) (29).

No Brasil, o primeiro transplante pulmonar ocorreu no ano de 1989, na Santa Casa de Misericórdia em Porto Alegre, e foi realizado pelo médico cirurgião Dr. José Camargo. No ano seguinte, no estado de São Paulo, a equipe do Dr. Vicente Forte fez o primeiro transplante pulmonar em humanos. Desde então, temos observado o aumento progressivo do número de transplantes realizados (29).

Atualmente, no Brasil, existem seis equipes transplantadoras de pulmão, distribuídas em três estados, sendo A Santa Casa de Porto Alegre - Rio Grande do Sul, e o Instituto do Coração - São Paulo as principais equipes transplantadoras do Brasil (31).

O transplante pulmonar é indicado aos pacientes que apresentam doença pulmonar crônica de caráter progressivo, com respostas insatisfatórias às alternativas terapêuticas. As indicações mais comuns são agrupadas em quatro categorias: 1. Pneumopatias obstrutivas: DPOC, enfisema por deficiência de alfa-1-antitripsina, bronquiolite obliterante; 2. Pneumopatias restritivas: fibrose pulmonar idiopática (FPI), sarcoidose, histiocitose de células de Langerhans, linfangioleiomiomatose, silicose; 3.

Pneumopatias supurativas: Fibrose cística (FC), bronquiectasias; 4. Pneumopatias vasculares: Hipertensão pulmonar primária ou secundária (29).

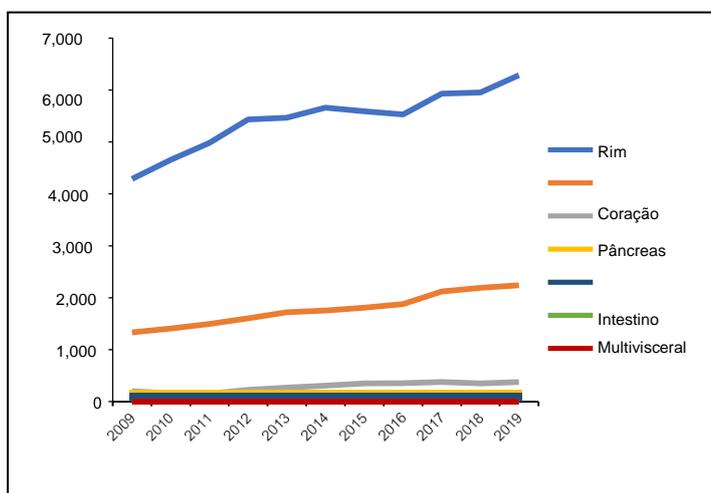
A indicação para o transplante só é dada quando o risco do paciente permanecer com a doença for maior que o risco do transplante. Segundo a Secretaria da Saúde do estado de São Paulo, o tempo médio de espera é de, aproximadamente, 23 meses com critérios de priorização indefinidos (1,32).

a) Doação de Órgãos

Desde os primórdios do emprego da técnica do transplante até a atualidade, os critérios para a doação de órgão, assim como os critérios clínicos para a aceitação dos órgãos empregados, têm sido revistos periodicamente e sofreram diversas atualizações. Tais revisões ocorrem em virtude da necessidade de aumentar as taxas de doação, qualidade do órgão e sobrevida do receptor. No entanto, ainda estamos longe de alcançar um equilíbrio entre o número de pulmões doados e a demanda pelo procedimento. Quando comparamos os números de transplantes de pulmão ao de outros órgãos sólidos, percebemos que o desequilíbrio é ainda maior. Dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos mostram que no ano de 2019, apenas 104 transplantes de pulmão foram realizados, em contrapartida, observamos 14.943 transplantes de córnea, 1.073 transplantes de rim com doadores vivos e 5.210 com doadores falecidos, 2.245 transplantes de fígado, 173 transplantes de pâncreas e 378 transplantes de coração (gráfico 02) (33).

Estudos apontam que aproximadamente 20% dos pulmões destinados à doação são aproveitados no mundo, mas, no estado de São Paulo, essa taxa é inferior a 5% (34).

Gráfico 2: Número absoluto de transplantes (anual).



	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Rim	4.291	4.654	4.982	5.431	5.465	5.661	5.591	5.532	5.930	5.949	6.283
Fígado	1.334	1.412	1.497	1.603	1.726	1.757	1.810	1.882	2.122	2.195	2.245
Coração	201	166	160	228	272	311	353	357	380	356	378
Pâncreas	160	133	181	153	143	128	121	135	113	146	173
Pulmão	59	61	49	69	80	67	74	92	112	121	104
Intestino	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Multivisceral	0	0	0	1	0	2	0	1	0	4	1

Fonte: Adaptado do Registro Brasileiro de Transplantes, 2019 (33).

Apesar dos grandes avanços da técnica cirúrgica e dos cuidados com o doador, a desproporção existente entre o número de órgãos viáveis destinados ao transplante e o número de pacientes que aguardam em fila é muito grande (35).

Alguns fatores interferem diretamente na viabilidade do órgão, muitas vezes levando recusa do órgão pelas equipes transplantadoras. Esses fatores podem estar relacionados ao processo de morte do paciente, como é o caso das lesões provenientes do processo de ME. Além disso, questões relacionadas a efetivação da doação também podem constituir um gargalo importante, como: recusa familiar, critérios rigorosos de seleção dos doadores, falta de notificação de potenciais doadores, problemas logísticos e de infraestrutura (34,36,37). A Tabela 01 relaciona os critérios clínicos utilizados no Brasil para a seleção de órgãos considerados viáveis para o transplante.

Tabela 01: Lista dos critérios clínicos utilizados para a seleção dos doadores de pulmão ideais.

CRITÉRIOS DE SELEÇÃO PARA DOADORES DE PULMÃO IDEAIS

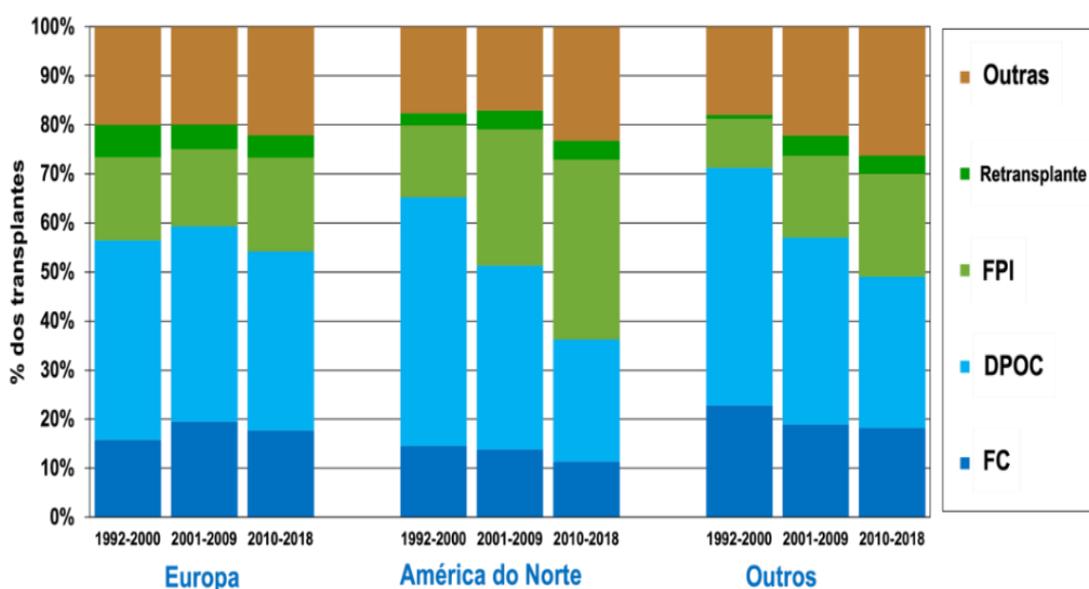
1. Idade < 55 anos
 2. Grupo sanguíneo ABO compatível, doador em morte encefálica
 3. Radiografia torácica clara
 4. PaO₂/fração de oxigênio inspirado (FiO₂) > 300 em 5 cm H₂O de pressão expiratória final positiva (PEEP)
 5. Tabagismo < 20 maços/ano
-

6. Ausência de trauma torácico
7. Ausência de evidências de aspiração/sepse
8. Nenhuma cirurgia cardiopulmonar prévia
9. Ausência de secreção purulenta na broncoscopia
10. Bacterioscopia - nenhum organismo detectado
11. Ausência de doença pulmonar primária ou infecção pulmonar ativa

Fonte: Adaptado de Snell e Westall, 2011 (38).

Nesse contexto, as principais indicações para o transplante pulmonar no mundo nas últimas duas décadas têm sido: 1) DPOC; 2) doenças pulmonares intersticiais ou fibrose pulmonar; 3) em casos de bronquiectasia, principalmente por FC; 4) retransplante; 5) hipertensão arterial pulmonar idiopática; dentre outras (Figura 01) (39,40).

Figura 1: Distribuição de diagnóstico de receptores adultos por local e ano.



Fonte: Modificado de ISHLT, 2021. FPI, fibrose pulmonar idiopática; DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica; FC, fibrose cística.

Diversas estratégias foram criadas a fim de promover o aumento da disponibilidade de órgãos ideais destinados à doação, dentre elas destacam-se: Extensão dos critérios clínicos na seleção de doadores, doação após parada circulatória e utilização da técnica de condicionamento pulmonar ex vivo. Com o

objetivo de aumentar a captação de pulmões, diversas equipes vêm adotando a inclusão de doadores limítrofes que flexibilizam e expandem os critérios de seleção (36, 38, 41-46). Pêgo-Fernandes (2011) demonstrou possíveis critérios clínicos que poderiam ser adotados e não causariam danos à técnica, pelo contrário, apresentavam resultados muito semelhantes (tabela 02) (44).

Tabela 2: Lista dos critérios clínicos estendidos utilizados para a seleção dos doadores de pulmão.

CRITÉRIOS ESTENDIDOS PARA DOADORES DE PULMÃO
1. Idade > 55 anos
2. Sangue não idêntico compatível
3. Radiografia de tórax com anormalidade focal ou unilateral
4. PaO ₂ /fração de oxigênio inspirado (FiO ₂) < 300 em 5 cm H ₂ O de pressão expiratória final positiva (PEEP)
5. Tabagismo > 20 maços/ano
6. Ausência de trauma torácico extenso
7. Cirurgia cardiopulmonar prévia
8. Secreção nas vias aéreas superiores

Fonte: Adaptado de Pêgo-Fernandes, 2011 (44).

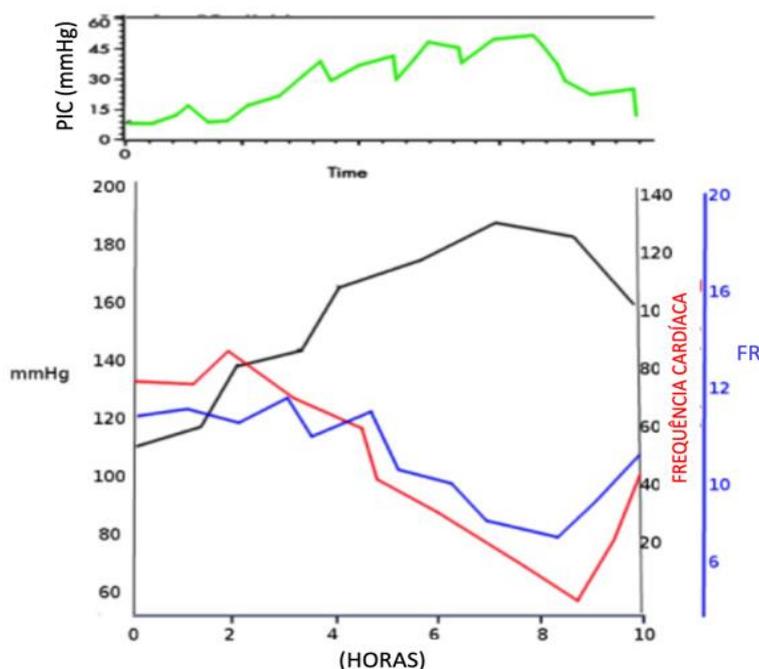
3.2 Morte Encefálica

A ME envolve uma série de alterações imunopatológicas repercutindo um efeito deletério aos órgãos e tecidos. Esse processo desencadeia uma série de eventos como: alterações hemodinâmicas, hormonais, metabólicas e inflamatórias (5). O manejo do doador que está em ME tem sido considerado uma das áreas mais negligenciadas da medicina para transplante, muitos dos potenciais órgãos são recusados para transplante devido as suas condições inadequadas (47).

Segundo a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), a ME é classificada como uma parada total e irreversível das funções encefálicas, com causa conhecida e constatada de modo indiscutível, caracterizada por coma aperceptivo, ausência da resposta motora supraespinal e apnéia. Trata-se de um processo complexo que altera a fisiologia e a bioquímica da célula (33).

O processo de ME tem início através de uma lesão encefálica decorrente de acidente vascular cerebral, falta de oxigenação cerebral, parada cardiorrespiratória, trauma ou hemorragia intracraniana que ocasiona o aumento da massa cerebral, associado ao aumento progressivo da pressão intracraniana, com comprometimento do retorno venoso. Na tentativa de manter a perfusão tecidual cerebral, uma série de alterações fisiológicas é desencadeada. A evolução dessas lesões pode culminar em ME. Após o estabelecimento da ME e consequente intensificação da atividade parassimpática, observa-se alta instabilidade hemodinâmica em resposta ao aumento da concentração sérica de catecolaminas (também chamada de tempestade autonômica). Em um segundo momento, e como consequência dessas alterações, ocorre um processo de hipertensão e taquicardia seguida de hipotensão arterial compensatória com formação de áreas isquêmicas comprometendo a região distal do mesencéfalo e o centro vagal cardiomotor, reduzindo a oxigenação e perfusão nos tecidos, além de comprometer a manutenção dos órgãos. Essa sequência de fatores também pode ser caracterizada como Reflexo de Cushing (figura 02) (5,9,48).

Figura 2: Reflexo de Cushing.

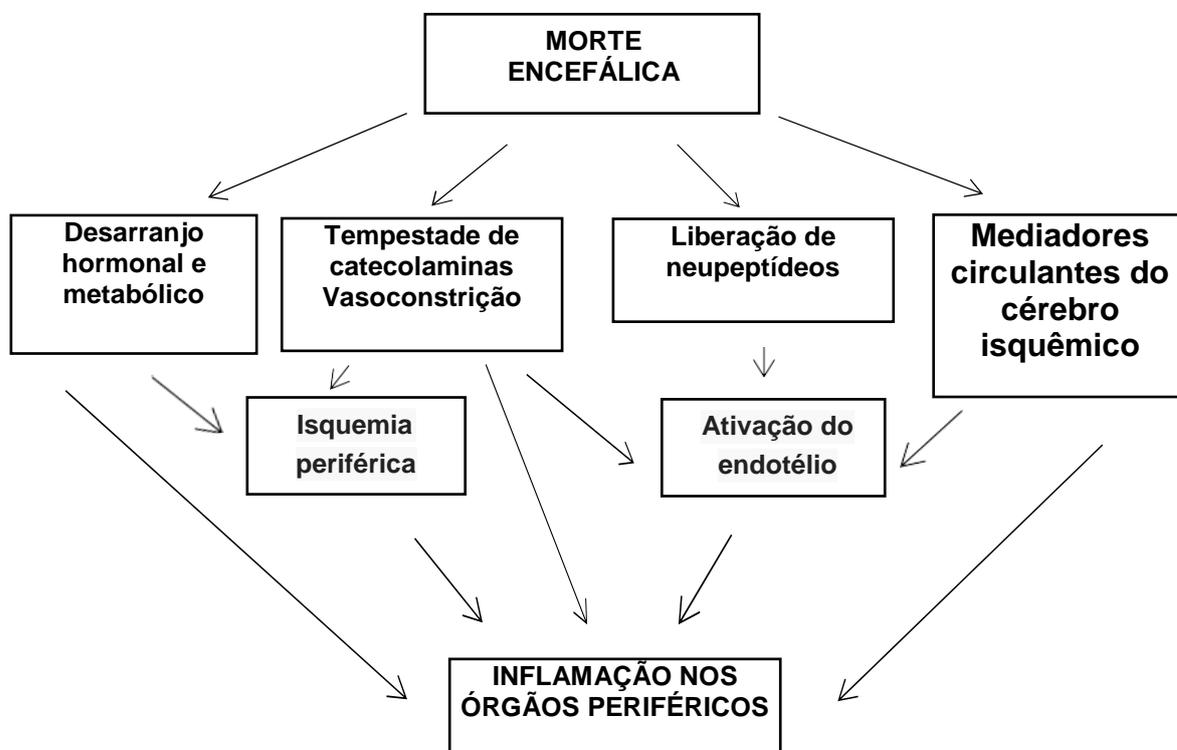


Fonte: Modificado de DINALLO S; WASEEM M., 2022. PIC, pressão intracraniana; FR, frequência respiratória (49).

Durante essas alterações, o metabolismo muda de aeróbico para anaeróbico. Essa tempestade promove uma série de eventos além da vasoconstrição, como o

aumento da resistência vascular sistêmica. A hipoperfusão é seguida de edema, isquemia, aumento da expressão de mediadores inflamatórios, moléculas de adesão e infiltração de células inflamatórias em diversos órgãos (5,48). Durante a ME, o doador acaba perdendo muito líquido hidroeletrólítico, como: sódio, potássio, e cálcio pela urina; tem uma queda hormonal (ADH, insulina, T3, T4) e entra em um quadro de diabetes insípido (figura 03) (47).

Figura 3: Mecanismos pelos quais a morte encefálica pode induzir uma resposta inflamatória sistêmica.



Fonte: Adaptado de Barklin, 2009 (47).

O pulmão é o órgão mais vulnerável aos efeitos prejudiciais da ME, menos de 20% dos potenciais doadores têm pulmões adequados para transplante, uma vez que a ME pode induzir a formação de edema pulmonar neurogênico (34,47). Estas alterações, iniciais e/ou tardias, influenciam a viabilidade de múltiplos órgãos destinados à doação.

Dentre as diversas alterações encontradas durante o processo de ME, destaca-se a crescente resposta inflamatória sistêmica que pode ser induzida por mediadores

inflamatórios liberados pelo cérebro isquêmico, alterações metabólicas, e a ativação do NF- κ B pela tempestade de catecolaminas (47).

A resposta inflamatória ocorre da seguinte forma: a inflamação aguda normalmente é responsável por combater infecções e remover e reparar tecidos, que sofrem lesões físicas, químicas ou biológicas, apresentando sinais locais característicos de sua ação como dor, calor, rubor e tumor. Caso a lesão persista, os mediadores inflamatórios podem mediar sinais e sintomas sistêmicos, essa resposta é conhecida por Resposta de Fase Aguda (50).

O NF- κ B é responsável por regular a expressão dos genes que controlam a morte celular programada, adesão celular, proliferação, inflamação e o remodelamento tecidual, via receptores de TNF- α , com consequente neurotoxicidade, atividade pró-inflamatória, hipóxia, disfunção mitocondrial e apoptose (10,11).

3.3 Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B)

Diante de um quadro de ME, o sistema nervoso desencadeia um processo inflamatório sistêmico através da complexa interação entre células reguladoras, efetoras e mediadoras, em resposta às alterações bioquímicas geradas (51-53). Esse fenômeno contribui também para o processo de deterioração progressiva da função do enxerto associada a alterações morfológicas vasculares e intersticiais no período pós-transplante.

Como controle deste processo inflamatório, encontramos o NF- κ B, um fator de transcrição gênica, descrito por Sen e Baltimore em 1986, constituído por duas subunidades proteicas (heterodímero), a p50 e a p65 ou RelA (54). Os fatores de transcrição são proteínas que, ao se ligarem no promotor e no enhancer dos genes, vão dar início ao processo de transcrição gênica coordenado (55).

Inicialmente descoberto em linfócitos T como regulador da transcrição da cadeia leve da k-imunoglobulina. A ação mais estabelecida do NF- κ B está relacionada à transcrição de genes ligados a resposta imunoinflamatória, em que regula a expressão de genes essenciais no processo inflamatório, além de estar relacionado à sobrevivência e proliferação celular, apoptose e funcionamento do Sistema Nervoso Central (55). Membro da família de fatores de transcrição redox-sensíveis presentes nas células endoteliais, células da musculatura lisa vascular, macrófagos e linfócitos (56,57). A família do NF- κ B ou família Rel é formada por cinco subunidades: p65

(RelA), c-Rel, RelB, p50 e p52. Essas subunidades se homo ou heterodimerizam para formar dímeros ativadores (p50-p65) ou repressores (p50-p50 e p52-p52) (55).

No citoplasma ele é encontrado em sua forma inativa, quando ligado as proteínas inibitórias I κ B (inibidor de kappa B, do inglês Inhibitory Kappa B) (trímero – p50/p65/I κ B), que são: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B-R, I κ B γ (p105), I κ B δ (p100) e Bcl-3. Essas proteínas foram identificadas em 1998 e são responsáveis por impedir que ele se desprenda do citoplasma e migre para o núcleo da célula, evitando que ele se ligue ao DNA e que inicie a transcrição dos genes pró-inflamatórios. O heterodímero p50-p65 é o mais abundante da família do NF- κ B e na maioria das vezes está associado ao I κ B α (50,55).

As I κ B por sua vez são fosforiladas por diversos estímulos, incluindo espécies reativas de oxigênio, citocinas e anóxia. A fosforilação das I κ B ocorre, principalmente, através do complexo I κ B quinase. Uma vez fosforilada, a I κ B se desprende do NF- κ B, ou seja, ela se separa da subunidade p50, permitindo a movimentação nuclear do NF- κ B, o qual interage com as regiões promotoras dos genes que regulam o aumento da expressão do gene alvo (58).

O NF- κ B pode ser ativado por diversos estímulos como citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, mediadores virais, mediadores bacterianos, fatores indutores de estresse, dentre outros. Sua ativação está associada a fosforilação das serinas 32 e 36 da I κ B que vão proporcionar a liberação do heterodímero para o núcleo, induzindo genes de atividade pró-apoptótica como enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e moléculas de adesão celular (50, 58-63).

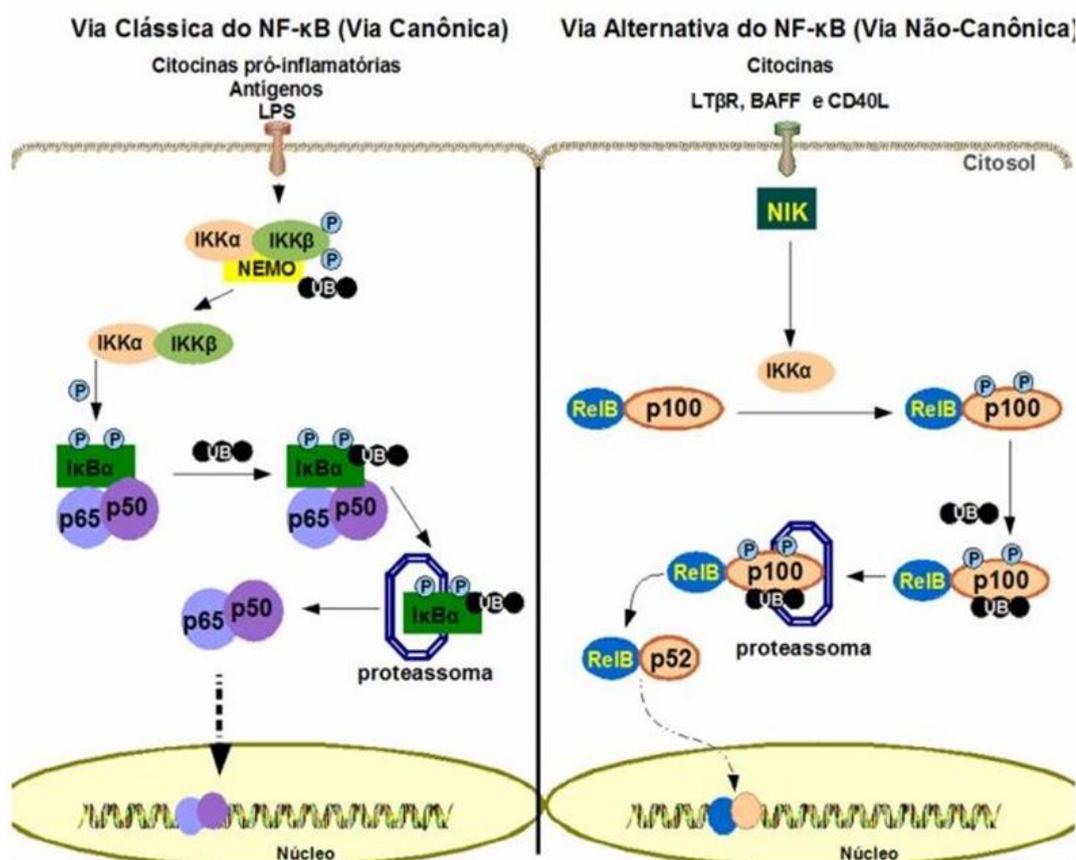
São descritas duas vias de ativação do NF- κ B, a via clássica (via canônica) e alternativa (via não-canônica). A via clássica é a mais comum e está associada à inflamação, resposta imunoinata, antiapoptose e manutenção celular. Já a via alternativa está associada à expressão de genes que atuam na manutenção dos órgãos linfoides secundários (55).

Na ativação pela via clássica (figura 04), a proteína inibitória (I κ B) é fosforilada pelo complexo de proteína quinase IKK (composto pela IKK α , IKK β e o NEMO - do inglês, NF- κ B essencial medulador). Essa fosforilação é responsável por ativar o processo de ubiquitinação e degradação da I κ B (ligada ao NF- κ B) pelo proteassoma. Após a degradação da I κ B, o NF- κ B que estava ligado a ela é liberado no citoplasma e migra para o núcleo onde atuará na regulação da transcrição de genes específicos.

Essa via pode ser ativada por diversos sinais inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas bacterianas (55).

A via alternativa (figura 04) é ativada por receptores da família do TNF, essa ativação é mediada pela quinase NIK (do inglês, NF- κ B inducing kinase) que comunica ao homodímero IKK α fosforilar a p100 que está associada à RelB. Neste momento, a p100 será ubiquitinada e degradada pelo proteassoma. O proteassoma degrada a parte C-terminal, deixando a N-terminal para formar o peptídeo p52. O dímero formado, p52-RelB, desloca-se para o núcleo e é responsável por ativar a expressão de genes específicos nos órgãos linfóides (55).

Figura 4: Vias de sinalização do NF- κ B.



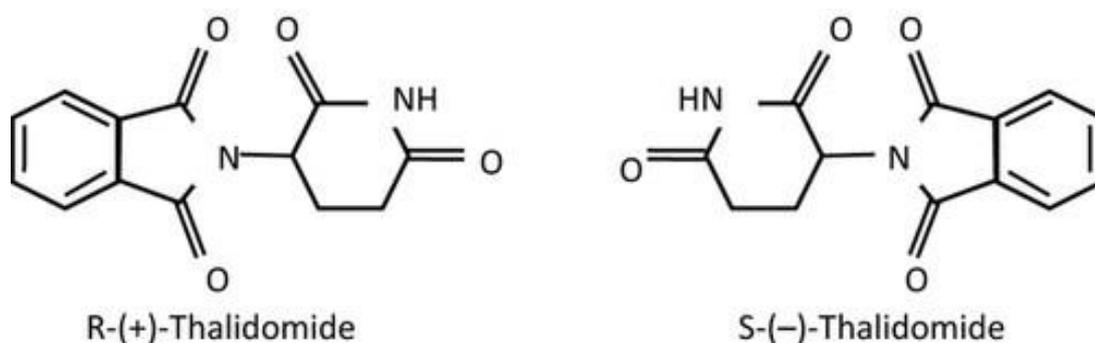
Fonte: Franco, 2010 (55).

Neste contexto, o NF- κ B contribui para a progressão da rejeição no transplante, pois a maioria dos genes pró-inflamatórios expressos durante a ME, e em resposta aos mediadores inflamatórios, são estimulados por ele na via clássica.

3.4 Talidomida

A Talidomida, também conhecida como α -N-ftalimidoglutarimida, é um agente sintético derivado do ácido glutâmico que possui um carbono quiral em sua estrutura, o que permite a existência de dois enantiômeros, ou seja, duas formas opticamente ativas, a Dextrogira (+) (R) e a Levogira (-) (S). Sabe-se que os enantiômeros possuem diferentes propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Alguns autores dizem que o isômero levógiro é o responsável pela teratogenia associada à Talidomida e o isômero dextrógiro é o responsável pelo efeito sedativo. Sua fórmula química é $C_{13}H_{10}N_2O_4$ (12,64).

Figura 5: Estrutura da Talidomida.



Fonte: Jin et al (2013) (64).

A Talidomida foi, inicialmente, sintetizada na Alemanha Ocidental nos laboratórios de Ciba em 1953, e depois pela empresa farmacêutica alemã Chemie Grunenthal em 1954. O fármaco teve sua patente aprovada como um antiemético associado à gravidez e efeitos sedativos. Foi amplamente comercializada em 1957 por gestantes que buscavam controlar seus frequentes enjoos. No entanto, nessa época, não se conheciam os efeitos teratogênicos do fármaco, efeitos esses que eram capazes de ultrapassar a barreira placentária e alterar o processo de formação do feto (65).

Associado ao seu grande salto de comercialização, foi observado um crescimento progressivo do número de casos de focomelia, uma anomalia congênita que impede a formação normal dos membros superiores e inferiores, caracterizada pela aproximação ou encurtamento dos membros junto ao tronco do feto. A

Talidomida não só estava relacionada aos casos de focomelia, como também estava relacionada aos graves defeitos visuais, auditivos, polidactilia, amelia, dismelia, defeitos na coluna vertebral, no tubo digestivo e alterações cardíacas. A ingestão de um único comprimido do medicamento nos três primeiros meses de gestação é capaz de alterar o processo de desenvolvimento do feto (65).

Em 1961, após a descoberta de seus efeitos teratogênicos, esse fármaco foi retirado imediatamente do mercado mundial. No entanto, anos depois, foi reintroduzido por ser benéfico para o tratamento de hanseníase. Desde então, estudos mostram sua eficácia para o tratamento de AIDS, lúpus e doenças crônico-degenerativas (65).

Atualmente, ações antiproliferativas, antifibróticas, hipnóticas, anti-inflamatórias, moduladora das respostas imune e teratogênica estão associadas ao fármaco. No âmbito da medicina cardiovascular, e pensando nos efeitos anti-inflamatórios, Park (2004) descreveu uma potente ação inibitória da Talidomida sobre a hiperplasia neointimal após lesão mecânica na artéria carótida de ratos. Em relação às alterações pulmonares, Liu (2017) descreveu o efeito protetor da Talidomida sob lesões pulmonares causadas por intoxicação em modelo de ratos (66,67).

Por seus efeitos sobre os mecanismos de inflamação, angiogênese e fibrose, a Talidomida pode ser empregada na prevenção e/ou tratamento do estado inflamatório, uma vez que ela inibe a produção do TNF- α , quimiocina pró-inflamatória envolvida na resposta imune e na cascata inflamatória (12). Neste contexto, Arai (2011) demonstrou resultados positivos do fármaco na prevenção do desenvolvimento de fibrose peritoneal em modelo experimental (68). Um estudo publicado por Majumdar, 2002, mostrou que o tratamento de células Jurkat com a Talidomida (50 μ g/ml) foi eficaz na supressão da ativação de NF- κ B (69).

Este medicamento possui também a capacidade de inibir a angiogênese, processo que é muito significativo para o crescimento e metástase de tumores sólidos (12). Aparentemente, a maior parte dos efeitos da Talidomida ocorre devido à supressão do fator NF- κ B, que está ligado a regulação do processo de transcrição de muitos genes inflamatórios como: TNF- α , IL -6 e IL- 12, apoptose e fatores angiogênicos. Sendo assim, indiretamente, ela é responsável por diminuir a produção de citocinas inflamatórias ao mesmo tempo em que estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (12-14, 64, 70).

Com o aperfeiçoamento da técnica cirúrgica, do controle de infecções, do manejo da imunossupressão e dos cuidados pós-operatórios, o transplante se consolidou como uma prática definitiva, fazendo com que suas indicações e demandas aumentassem muito desde então, desta forma, é importante que esforços sejam concentrados a fim de aumentar a disponibilidade desses órgãos. A Talidomida se insere nesse contexto, pois é um fármaco com potencial benéfico no tratamento e preservação de órgãos para doação e ainda pouco explorado.

Considerando que o processo inflamatório gerado durante a ME constitui uma importante barreira para o sucesso dos transplantes pulmonares e a Talidomida apresenta significativos efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores, o estudo dos seus efeitos nos doadores de órgãos é promissor. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram efeitos benéficos da medicação no transplante de fígado e rim, no entanto, não há na literatura trabalhos que relacionem o tratamento de doadores de pulmão ao uso da Talidomida (71, 72). O presente trabalho se insere neste contexto, pois vai avaliar e comparar o efeito do fármaco sobre a inflamação no pulmão, considerando o processo inflamatório gerado durante os 360 minutos pós indução da morte encefálica.

4 MÉTODOS

4.1 Material e Métodos

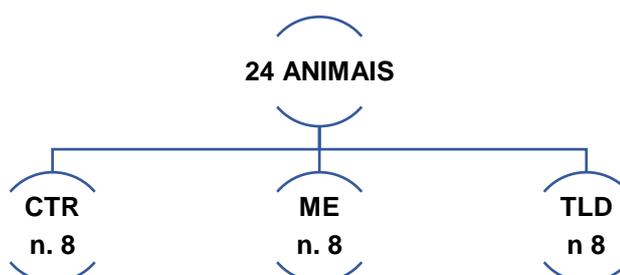
Este estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica LIM 61 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Toda metodologia aplicada foi desenvolvida em concordância com o guia institucional de cuidados e uso de laboratório, após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O protocolo foi baseado nos princípios éticos segundo as normas vigentes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. SDC 4512/17/012 e CEUA 946/2017.

Os animais utilizados durante o experimento foram fornecidos pelo Biotério de Produção de Ratos, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais fornecidos foram mantidos no biotério da Divisão de Experimentação do Instituto do Coração, em ambiente convencional, água e ração balanceada ad libitum. Todo protocolo experimental foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica LIM 61, localizado na Divisão de Experimentação Animal do Instituto do Coração – do complexo HC FM USP.

4.1.1 Grupos experimentais

Para o estudo foram utilizados 24 ratos Wistar, machos, adultos, com peso médio de 340 a 450g. A espécie e o cálculo amostral foram baseados na literatura e em projetos já desenvolvidos no laboratório. Os animais foram acompanhados por um período de 360 minutos após a indução da ME, com exceção do grupo CTR.

Eles foram distribuídos em três grupos experimentais, conforme segue:

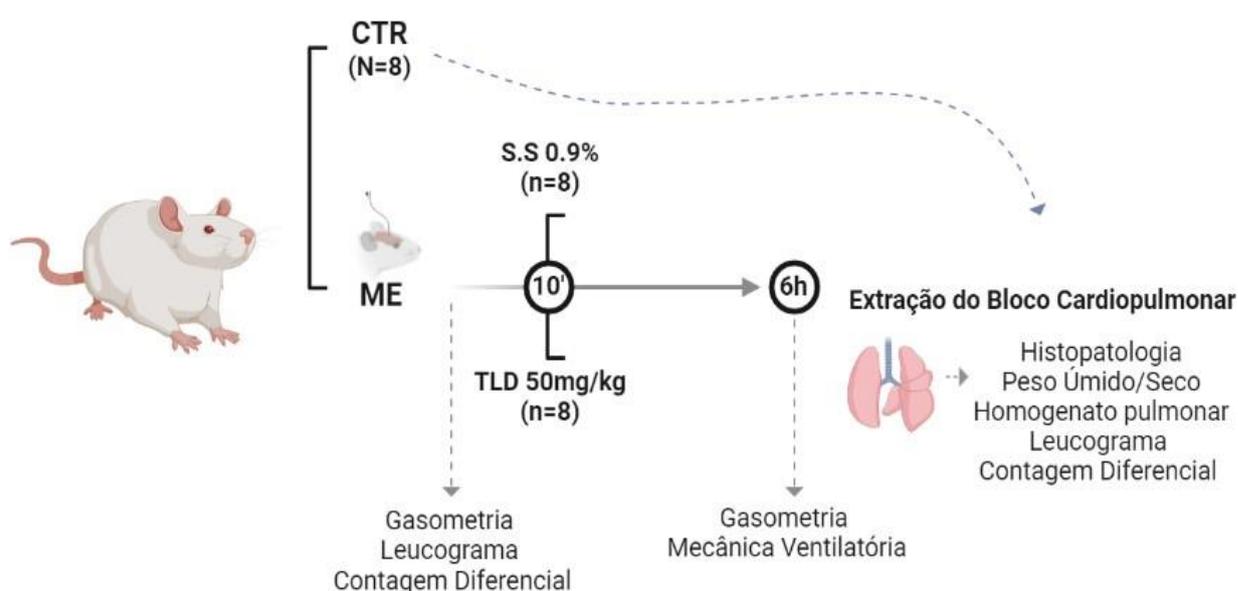


Controle (CTR): Animais submetidos à extração do bloco cardiopulmonar.

Morte Encefálica (ME): Animais submetidos à indução da morte encefálica, tratados com Solução Salina a 0.9% (via i.p, 2mL, 10 min. após indução da morte encefálica) e mantidos em ventilação mecânica por 6 horas. Após este período, foi realizada a extração do bloco cardiopulmonar.

Morte Encefálica + Talidomida (TLD): Animais submetidos à indução da morte encefálica, tratados com Talidomida (via i.p, 50 mg/kg, 10 min. após indução da morte encefálica) e mantidos em ventilação mecânica por 6 horas. Após este período, foi realizada a extração do bloco cardiopulmonar.

Figura 6: Desenho experimental.



Fonte: CTR, controle; ME, morte encefálica; S.S., solução salina; TLD, Talidomida.

4.2 Procedimento Cirúrgico

4.2.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados em câmara fechada com Isoflurano a 5%, seguida de intubação orotraqueal e ventilação mecânica para pequenos animais (Harvard Apparatus, modelo 683, MA, USA) com 21% de FiO₂, volume corrente de 10 mL/kg, 60 ciclos por minuto e PEEP de 3,0 cmH₂O. O suporte anestésico foi mantido com Isoflurano a 2%.

4.1.1.2 Intervenção cirúrgica

Após anestesia e pesagem dos animais, todos foram submetidos à intubação orotraqueal e foram conectados ao aparelho de ventilação. Nos animais submetidos

à morte encefálica, foi realizada a assepsia com solução alcoólica de digliconato de clorexidina (0,5%), e em seguida a tricotomia da região do pescoço, da região cranial e da região femoral anterior, após isso, com o animal devidamente posicionado, foi feita a traqueostomia com cânula metálica rígida para conexão do aparelho de ventilação mecânica, em seguida, a artéria e veia femoral direita foram expostas, dissecadas e cateterizadas utilizando cateter confeccionados com perfusor infantil e dispositivo periférico intravenoso (24G), preenchidos com solução salina heparinizada (500 IU/mL) e inseridos delicadamente com auxílio de microscópio estereoscópico (Zeiss, modelo Stemi 508). O cateter da artéria foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um monitor (DIXTAL®, DX 2021, Brasil) para registro da pressão Arterial Média (PAM). O cateter da veia femoral foi destinado para a infusão de solução salina 0,9% (hidratação), e retirada de alíquotas de sangue para dados gasométricos mensurados ao final do experimento (360 min).

Antes da indução da morte encefálica, e após as 6 horas de procedimento, foram coletadas amostras de sangue da cauda dos animais para análises de leucograma, e diferencial/total.

4.1.1.1.2 Modelo experimental de morte encefálica

Os animais foram posicionados em decúbito ventral para realização da trepanação craniana. Utilizando-se uma broca motorizada, foi realizada a perfuração da calota craniana para posterior inserção de um cateter Fogarty-4F (Edwards Lifescience LLC, Irvine, CA, USA). A efetiva indução da ME foi realizada através da rápida insuflação do cateter com 500 µL de solução salina (0,9%), sendo confirmada através do pico hipertensivo, ausência de reflexos, midríase bilateral e apneia. Após a indução da ME, a anestesia foi suspensa e o animal foi mantido em ventilação mecânica (FiO₂ de 21%, pressão positiva expiratória final - PEEP de 3 cmH₂O, 10 mL/kg e 60 cpm) por 360 minutos e recebeu solução salina 0,9% através da veia femoral. A pressão arterial foi aferida durante todo o período de observação (360 minutos).

a) Extração do bloco cardiopulmonar

A abertura da cavidade abdominal (laparotomia) foi realizada para posterior ressecção do esterno, e abertura radial do diafragma, com atenção para não causar lesões aos pulmões. A timectomia foi realizada para expor o coração e dar início à

extração do bloco cardiopulmonar, a traqueia foi ligada abaixo da cânula de traqueostomia e a extração ocorreu no sentido craniocaudal. O bloco cardiopulmonar foi removido em capacidade pulmonar total.

4.3 Análise Gasométrica e Metabólica

As análises gasométricas foram realizadas em equipamento de gasometria (Epic Blood Analysis System, Ontario, Canadá), determinando o perfil de saturação e efetividade da troca gasosa no parênquima pulmonar. Para tanto, amostras de sangue arterial e venoso dos animais foram coletadas por meio do acesso à artéria e veia femoral. As amostras foram coletadas antes da indução do processo de morte encefálica (basal) e ao final do experimento. Foram considerados os seguintes parâmetros: pressão arterial de oxigênio (PO_2), pressão arterial de dióxido de carbono (PCO_2), saturação de oxigênio ($SatO_2$), potencial hidrogeniônico (pH), hematócrito (Hct), lactato, bicarbonato (HCO_3^-), glicose, creatinina, excesso de base (BE) e índice de oxigenação (IO).

4.4 Análise da Mecânica Pulmonar

A mecânica ventilatória dos animais foi mensurada ao final do processo de ME. Os animais foram conectados pela cânula de traqueostomia ao ventilador (flexiVent®, SCIREQ, Montreal, Canadá), posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica e estabilizados através de seus membros com fita adesiva.

O ventilador mecânico foi controlado por um computador, que intercalava a ventilação mecânica com uma variedade de manobras (perturbações) com pressão e volume controlados para obter medidas precisas e reprodutíveis de mecânica respiratória. Os dados foram coletados através de um software específico flexiWare 7, permitindo a análise, a visualização de gráficos da ventilação e o arquivamento dos dados.

4.1.4 Medida dos parâmetros do modelo de fase constante

Para a obtenção da impedância do sistema respiratório foi aplicada uma perturbação (quick-prime) que consiste na imposição de um fluxo de ar com amplitude correspondente à soma de senoides de frequências entre 1,00 a 20,5 Hz. A partir dessas perturbações, foram obtidos os valores de resistência newtoniana (R_N), resistência tecidual (G), elastância tecidual (H) e histeresividade (η).

4.1.1.4 Curva pressão-volume

Para obtenção dos pontos da curva de pressão-volume, a pressão na traqueia foi elevada até 30 cmH₂O em intervalos igualmente espaçados de pressão pré-estabelecidos, com registros dos valores de volume de platô correspondentes a essas pressões. O mesmo procedimento, com decrementos na pressão, foi realizado para a obtenção do ramo expiratório da curva.

4.1.1.1.4 Manobras ventilatórias

Após a conexão do animal ao ventilador, conforme descrito previamente, foram transcorridos cinco minutos para acomodação do animal, verificação de possíveis vazamentos, obstruções e correções do posicionamento em relação ao ventilador.

Após o período de estabilização, foi realizada uma perturbação “deep inflation”, utilizadas para determinação da capacidade inspiratória (CI). Após esta manobra ventilatória, foi realizada uma perturbação “quick-prime”, utilizadas para determinação dos parâmetros do modelo de fase constante (R_N , G, H). Foram realizadas também uma sequência de curva Pressão vs. Volume (Curva PV), que proporcionou as medidas da complacência estática (Cst), CI e área da curva.

4.5 Análise da razão Peso úmido/Peso seco

Para análise da relação peso úmido/seco, o lobo caudal do pulmão direito foi coletado. Após a extração, o peso úmido (g) foi aferido em balança semianalítica, enquanto o peso seco (g) do pulmão foi avaliado somente após três dias em processo de secagem à 80 °C.

$$\text{Razão U/S} = \text{peso úmido (g)/peso (g)}$$

4.6 Dosagem de Citocinas no Tecido Pulmonar

A quantificação das citocinas inflamatórias IL-6 (RAB0312 - EMPRESA SIGMA-ALDRICH), IL-10 (E0108Ra - EMPRESA BT LAB), TNF- α (RAB0480 - EMPRESA SIGMA-ALDRICH) e IL-1 β (RAB0278 - EMPRESA SIGMA-ALDRICH) presentes no tecido pulmonar (amostra do pulmão esquerdo) foi realizada através do método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga refrigerada a 4°C a 3000 rpm, o sobrenadante foi retirado e transferido para tubos tipo eppendorf e armazenados a -80°C até análise das amostras. No dia

da quantificação das citocinas, as amostras previamente coletadas foram distribuídas em uma placa com 96 poços, conforme especificações do kit. Após as etapas, a reação foi lida no leitor de ELISA (Biotek - Instruments).

A placa foi colocada em uma leitora específica, que está associada a um software adequado, responsável por realizar a leitura da absorbância da placa, os resultados são expressos na tela do computador, demonstrando curva padrão validada.

4.7 Análise de imunohistoquímica no Tecido Pulmonar

A análise de imunohistoquímica foi realizada através da coloração das lâminas brancas com o anticorpo Anti-NF- κ B (p65) (cat. N^o SAB 4502615 - EMPRESA SIGMA-ALDRICH). O anticorpo é responsável por detectar níveis endógenos de proteína total NF- κ B p65 ou Rel A.

O protocolo de imunohistoquímica adotado seguiu a seguinte sequência: desparafinar as lâminas em xilol (02 banhos de 10 min cada), hidratar as lâminas em 02 banhos de álcool 99°, 02 banhos de álcool 96°, 01 banho de álcool 70°, lavar as lâminas em água corrente e água destilada, bloquear a peroxidase (01 vez com água oxigenada 10vol. 10 min), lavar em água corrente e água destilada, recuperação antigênica em panela de pressão elétrica (15 min em solução Trilogy (Cell Marque)), lavar em água corrente e água destilada, bloquear a proteína, 15 min, lavar 03 vezes em TBS, incubar Over Night com anticorpo primário em câmara úmida, lavar 03 vezes em TBS, incubar com REAVEAL Complement (Spring), 30 min em câmara úmida, lavar 03 vezes em TBS, incubar com REAVEAL HRP Conjugate (Spring), 30 min em câmara úmida, lavar 03 vezes em TBS, revelar com DAB líquido (Spring) por 10 min, lavar em água corrente e água destilada, contra corar com Hematoxilina de Harris, 3 min, lavar em água corrente e água destilada, desidratar as lâminas em 01 banho de álcool 70°, 01 banho de álcool 96°, 03 banhos em álcool 99° e 03 banhos de Xilol, e, por fim, montar as lâminas com lamínulas e meio de montagem.

O resultado da coloração foi analisado usando o software de análise de imagens Image J. Todo o corte de tecido foi escaneado ao microscópio de luz e, em seguida, dez campos aleatórios foram escolhidos com aumento de 40x. A área manchada de marrom ao redor do núcleo da célula manchada de azul foi definida como regiões de interesse. O aumento da expressão de NF- κ B em diferentes grupos

para controle foi calculado seguindo a fórmula: Aumento de dobra no Grupo X (%) = Valor de cor no Grupo X/Valor de cor no Controle*100%.

4.8 Marcadores Redoxes no Homogenato Pulmonar

Depois de homogeneizado em tampão PBS (do inglês, Phosphate-buffered Saline), o tecido pulmonar foi utilizado para os ensaios bioquímicos (amostra do pulmão esquerdo). Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram avaliados pelo ensaio do sal azul de nitrotetrazólio (Cat. No. N6876, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) em um comprimento de onda de 630nm (73). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida monitorando a inibição da auto-oxidação da adrenalina (Cat. No. E4642, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) em um comprimento de onda de 480 nm (74). A atividade da catalase (CAT) foi medida pela taxa de diminuição das concentrações de peróxido de hidrogênio (Cat. No. 102329854, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) monitoradas a 240 nm (75). Como índice de dano oxidativo induzido pela peroxidação lipídica, utilizamos o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Cat. No. T5500, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) para analisar produtos de malondialdeído (MDA) durante uma reação de aquecimento ácido monitorada a 532 nm (76). A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi medida usando peróxido de hidrogênio, brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; Cat. No. H5882, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e tetrametilbenzidina (TMB; Cat. No. 860336, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) em um comprimento de onda de 630 nm (77).

4.9 Avaliação Histopatológica Pulmonar

Para avaliação histopatológica pulmonar, o lobo cranial do pulmão direito foi cuidadosamente coletado, lavado com solução fisiológica à 4°C e fixado em formaldeído 10% por 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram colocados em caixetas perfuradas e mantidas em etanol 70% até a inclusão em blocos de parafina.

O processo de parafinização foi realizado pelo processador automático de tecido Histoquine (Jung-Histokinette 2000 Leica, Nussloch, Alemanha), com duração aproximada de 14 horas. O processo foi iniciado pela desidratação dos tecidos em concentrações progressivas de álcool (álcool 50%, álcool 70%, álcool 96% (2 banhos)), álcool absoluto (2 banhos), seguido para diafanização, e passagem dos tecidos em uma solução de álcool absoluto + xilol e xilol (3 banhos), para serem então

imersos em parafina fundida a 60°C. O material parafinado foi incluído em blocos e permanecerá em temperatura ambiente.

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

Para a coloração por hematoxilina e eosina (H&E), após desparafinização, as lâminas foram deixadas, aproximadamente, uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, foram imersas em hematoxilina (previamente filtrada) durante 10 minutos e, posteriormente, lavadas em água corrente. Após 10 minutos de lavagem, as lâminas foram imersas em eosina por 3 minutos. Após esse período, foram fixadas com ácido acético, desidratadas e montadas com lamínulas com meio permanente Permount (Fisher Chemical, Pittsburgh, EUA).

A análise morfológica da lesão pulmonar foi realizada de acordo com um sistema de pontuação semiquantitativo KREBS et al (2010) (78). As secções de tecido foram coradas com H&E e marcadas para lesão pulmonar aguda usando os seguintes parâmetros: edema intersticial, edema intra-alveolar, hemorragia, infiltração celular e formação de membrana hialina. A gravidade desses achados foi graduada em uma escala de cinco pontos da seguinte forma: 0, tecido normal; 1, alteração inflamatória mínima; 2, alterações inflamatórias leves a moderadas; 3, lesão inflamatória moderada; 4, lesão inflamatória moderada a grave; 5, lesão inflamatória grave com obliteração total do campo. Três investigadores independentes realizaram todas as avaliações de forma cega, através da análise da imagem digitalizada das fotomicrografias em software especializado, com uma ampliação de x40 (software de análise de imagens Image J) para análise do score de lesão pulmonar.

Para a contagem total do infiltrado leucocitário foi utilizada a ampliação de x100 para 10 campos aleatórios e não coincidentes.

4.10 Leucograma

Para contagem do número total de leucócitos, amostras de 20 µL de sangue periférico foram coletadas na cauda dos animais e adicionadas em 380 µL de solução de Turk para a quantificação do número total de leucócitos em câmara de Neubauer.

Para a determinação diferencial dos leucócitos foi realizada a técnica de extensão sanguínea corada pelo método Instant Prov® (Newprov - Produtos para Laboratórios Ltda, Pinhais, PR, Brasil). Foram contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se os tipos celulares.

4.11 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão da média (E.P.M.), e para análise de normalidade igualdade de variância foram utilizados os testes de Shapiro Wilk e Levene respectivamente. Os gráficos foram produzidos e analisados estatisticamente pelo software Graph Pad Prism 8. Foram considerados significantes os resultados que apresentarem probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ($p < 0,05$). Para comparação de dois grupos foi realizado o teste t de Student. Já para a comparação de mais de dois grupos e um único fator, foram realizados One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, e quando analisado dois fatores foi utilizado Two-way ANOVA com pós-teste de Sidak.

NOTA: O projeto inicial previa o tratamento dos animais através da gavagem de 200mg de Talidomida e foi executado em parceria com a disciplina de Neurologia-FMUSP. Nosso laboratório avaliou os pulmões, e o grupo parceiro o fígado e rins. Dado que não observamos efeitos da Talidomida nos pulmões dos animais tratados, a banca de qualificação sugeriu a alteração da via de administração. Desta maneira, os experimentos foram repetidos utilizando a via intraperitoneal e os resultados serão apresentados a seguir. Os resultados dos experimentos iniciais, com gavagem, avaliando os pulmões estão presentes nos anexos.

5 RESULTADOS

5.1 Modelo de Morte Encefálica

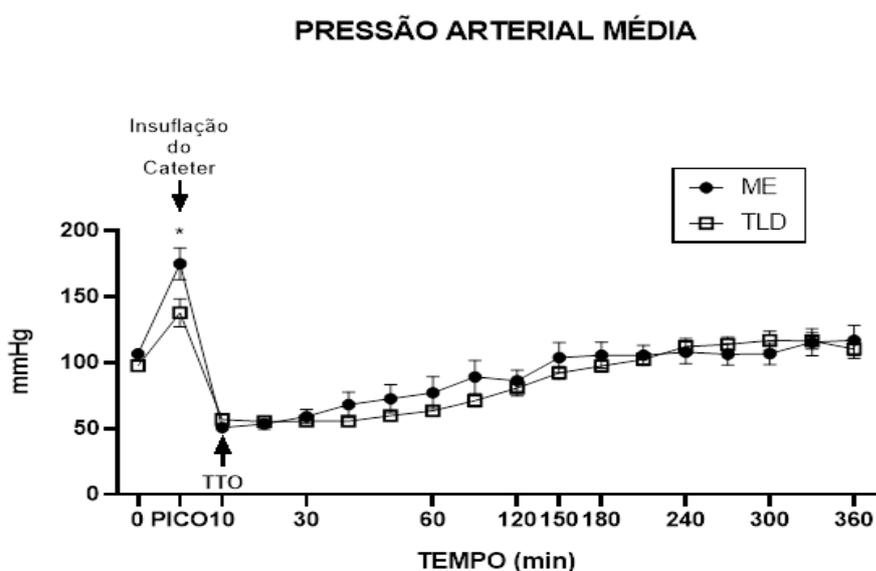
5.1.1 Parâmetro hemodinâmico

Ao observar o gráfico da PAM (gráfico 03), podemos notar que, após a indução da ME, foi gerado um pico hipertensivo seguido de uma hipotensão arterial. A hipotensão persistiu até 150' de experimento e, a partir de então, recuperou o valor similar aos dados basais até o final do experimento (360').

Não foram observadas diferenças na PAM basal entre os grupos ME e TLD, a PAM basal dos dois grupos foi: ME; $106,5 \pm 2,95$ vs. TLD; $97,50 \pm 2,65$ mmHg, $p=0,9999$, Two-way ANOVA - teste de Sidak).

Após a insuflação do cateter, ambos os grupos apresentaram um aumento significativo abrupto nos níveis pressóricos (pico hipertensivo) (ME: $174,87 \pm 11,97$ vs. TLD: $137,75 \pm 10,43$ mmHg, $p=0,0098$, Two-way ANOVA - teste de Sidak), seguido por uma rápida queda na PAM (hipotensão arterial) (10 min – ME: $50,75 \pm 3,48$ vs. TLD: $56,75 \pm 3,41$ mmHg, Two-way ANOVA - teste de Sidak). Em, aproximadamente 150' de experimento, os níveis de PAM retornaram a valores próximos da normotensão (150 min – ME: $103,75 \pm 11,29$ e TLD: $92 \pm 5,06$ mmHg, Two-way ANOVA - teste de Sidak, sem diferença estatística entre os grupos, $p=0,9964$).

Gráfico 3: Avaliação da pressão arterial média ao longo do tempo.



Monitoramento da PAM nos grupos TLD e ME durante os 360' de experimento. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média, considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. TTO, tratamento. * $p = 0,0098$.

5.1.1.1 Mecânica pulmonar

Ao final do experimento, foi realizada a análise da mecânica pulmonar dos animais submetidos à morte encefálica, com o objetivo de avaliar os parâmetros mecânicos e resistivos do sistema respiratório.

Os valores de mecânica pulmonar estão apresentados na tabela 03, no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$) nos parâmetros estudados.

Tabela 3: Avaliação da mecânica ventilatória ao final do experimento.

MECÂNICA VENTILATÓRIA	GRUPO		p
	ME	TLD	
<i>Cl, mL</i>	13,44 ± 0,75	11,51 ± 0,70	0,0813
<i>Rrs, cmH₂O.s/mL</i>	0,12 ± 0,005	0,12 ± 0,009	0,8827
<i>Ers, cmH₂O/mL</i>	1,69 ± 0,09	1,71 ± 0,10	0,8727
<i>Crs, mL/cmH₂O</i>	0,60 ± 0,02	0,59 ± 0,03	0,8669
<i>R_N, cmH₂O.s/mL</i>	0,07 ± 0,008	0,07 ± 0,006	0,4295
<i>G, cmH₂O/s/mL</i>	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,8792
<i>H, cmH₂O/mL</i>	2,05 ± 0,21	2,30 ± 0,19	0,4023
<i>Cst, mL/cmH₂O</i>	1,21 ± 0,07	1,11 ± 0,06	0,3254
<i>PIP/cmH₂O</i>	11,24 ± 0,48	10,19 ± 0,27	0,0948

Análise da mecânica ventilatória. Os valores estão expressos com média ± erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (teste t de Student) considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Cl, capacidade inspiratória; Rrs, resistência do sistema respiratório; Ers, elastância do sistema respiratório; Crs, complacência do sistema respiratório; RN, resistência newtoniana; G, resistência tecidual; H, elastância tecidual; Cst, complacência estática; PIP, pressão inspiratória de pico.

5.1.1.1.1 Parâmetros gasométricos e metabólicos em amostra de sangue arterial

Tanto no início, quanto no final do experimento, foi feita a análise dos parâmetros gasométricos e metabólicos dos animais que foram submetidos à ME. Não foram observadas alterações significativas entre os grupos no momento inicial, reforçando a homogeneidade entre os animais dos grupos. A análise gasométrica e

metabólica avaliada no momento final do experimento não demonstrou diferenças significativas entre os grupos (tabela 04, $p < 0,05$).

Tabela 4: Avaliação dos parâmetros gasométricos e metabólicos no momento final em amostra de sangue arterial.

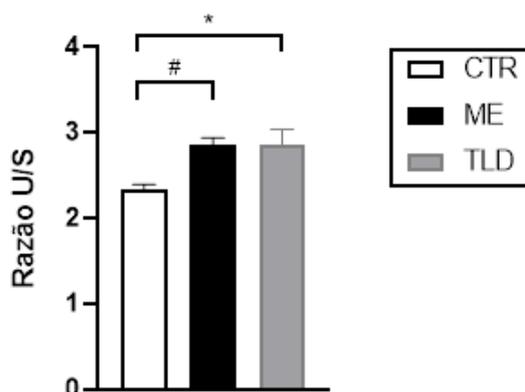
PARÂMETROS GASOMÉTRICOS E METABÓLICOS			
FINAL	ME	TLD	p
pH	7,38 ± 0,01	7,42 ± 0,02	0,2011
pCO₂, mmHg	28,20 ± 2,36	23,70 ± 2,02	0,17
pO₂, mmHg	101,2 ± 13,88	92,26 ± 5,48	0,5785
Hct, %	33,71 ± 1,89	29 ± 1,2	0,0553
SatO₂, %	98,02 ± 0,63	97,34 ± 0,72	0,5785
Lactato, mmol/L	1,77 ± 0,40	1,46 ± 0,30	0,5421
BE, mmol/L	- 6,75 ± 0,87	- 7,63 ± 0,55	0,1034
Glicose, mg/dL	109,4 ± 6,96	100,1 ± 6,14	0,3448
Creatinina, mg/dL	0,57 ± 0,04	0,43 ± 0,05	0,059
HCO₃⁻, mmol/L	16,55 ± 1,29	16,94 ± 1,03	0,8181
IO	439,3 ± 26,11	482,1 ± 66,11	0,5785

Análise de parâmetros gasométricos e metabólicos em amostra de sangue arterial. Os valores estão expressos com média ± erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (teste t de Student) considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Ph, potencial hidrogeniônico; PCO₂, pressão arterial de dióxido de carbono; PO₂, pressão arterial de oxigênio; Hct, hematócrito; SatO₂, saturação de oxigênio; BE, excesso de base; HCO₃, bicarbonato; IO, Índice de oxigenação.

a) Peso úmido x peso seco

Na análise da relação peso úmido/seco, os animais do grupo ME e TLD apresentaram um aumento estatisticamente significativo quando comparados aos do grupo CTR ($p=0,0083$ e $p=0,0092$ respectivamente). No entanto, o grupo ME e o grupo TLD, não apresentaram diferença estatística entre eles (CTR 2,33 ± 0,05; ME 2,84 ± 0,08; TLD 2,86 ± 0,17 razão U/S, One-way ANOVA - pós-teste de Tukey) (gráfico 04).

Gráfico 4: Peso úmido/peso seco.

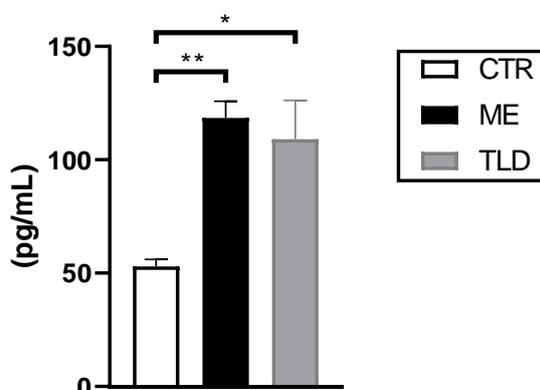
RAZÃO PESO ÚMIDO / PESO SECO

Análise de peso úmido/seco. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. * $p = 0,0092$; # $p = 0,0083$.

b) Marcadores inflamatórios

Observamos que os grupos submetidos a ME apresentaram um aumento na produção de IL-6 (CTR $52,93 \pm 3,11$; ME $118,4 \pm 7,45$; TLD $109,1 \pm 17,06$ pg/mL, One-way ANOVA - com pós-teste de Tukey) em comparação do grupo CTR (ME vs CTR $p = 0,0067$; TLD vs CTR $0,0137$) (gráfico 05). Já o marcador IL-10 (CTR $434,8 \pm 19,37$; ME $479 \pm 40,18$; TLD $468,2 \pm 39,07$ pg/mL, One-way ANOVA - com pós-teste de Tukey) não apresentou diferença estatística significativa ($p = 0,7154$) entre os grupos.

Gráfico 5: Avaliação da IL - 6 em amostra de homogenato pulmonar de ratos.

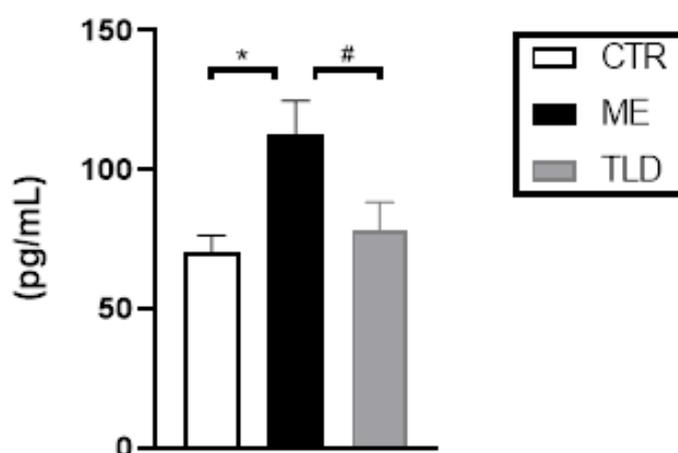
INTERLEUCINA - 6

Avaliação do marcador inflamatório IL-6. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. * $p = 0,0137$; ** $p = 0,0067$.

A quantificação de TNF- α (CTR 70,29 \pm 6,03; ME 112,9 \pm 11,69; TLD 78,10 \pm 10,27 pg/mL, One-way ANOVA - com pós-teste de Tukey) foi maior no grupo ME em comparação ao CTR ($p=0,0152$) e TLD ($p=0,0495$). Na comparação do grupo CTR com o grupo TLD, não observamos diferença significativa (gráfico 06).

Gráfico 6: Avaliação do Fator de Necrose Tumoral - α em amostra de homogenato pulmonar de ratos.

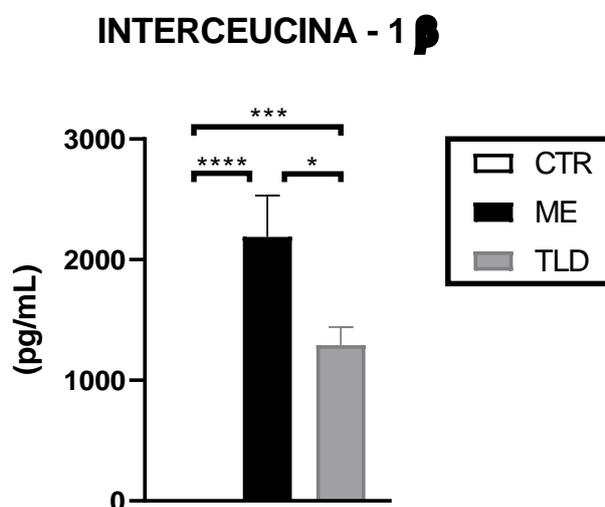
FATOR DE NECROSE TUMORAL - α



Avaliação do marcador inflamatório TNF- α . Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. * $p=0,0152$; # $p=0,0495$.

A quantificação de IL-1 β (CTR 0 \pm 0; ME 2189 \pm 342,2; TLD 1292 \pm 148,7 pg/mL, One-way ANOVA - com pós-teste de Tukey) foi maior no grupo ME e TLD em comparação ao CTR ($p = < 0,0001$ e $p=0,0009$, respectivamente), e também foi maior no grupo ME quando comparado ao grupo TLD ($p=0,0174$) (gráfico 07). Os níveis de IL-1 β não foram detectados no grupo controle.

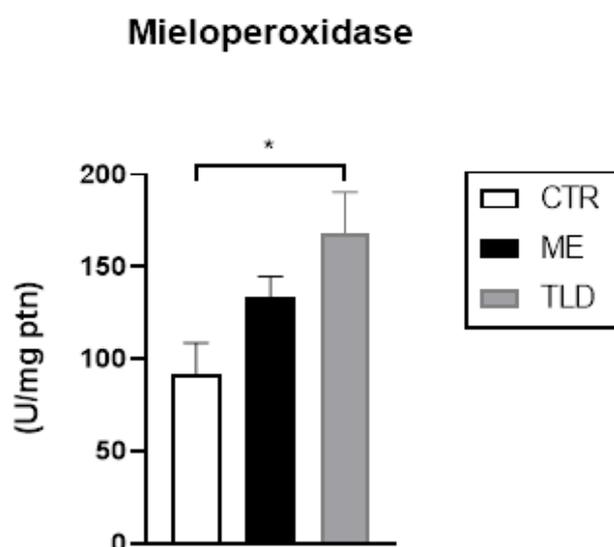
Gráfico 7: Avaliação da Interceucina - 1 β em amostra de homogenato pulmonar de ratos.



Avaliação do marcador inflamatório IL-1 β . Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. * $p = 0,0174$; *** $p = 0,0009$; **** $p < 0,0001$.

O infiltrado neutrofílico foi avaliado pela atividade da MPO (mieloperoxidase), enzima liberada pelos neutrófilos. Foi observada que a atividade da MPO estava elevada no grupo TLD quando comparada ao grupo CTR ($p = 0,0166$) (gráfico 08).

Gráfico 8: Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no homogenato pulmonar de ratos.

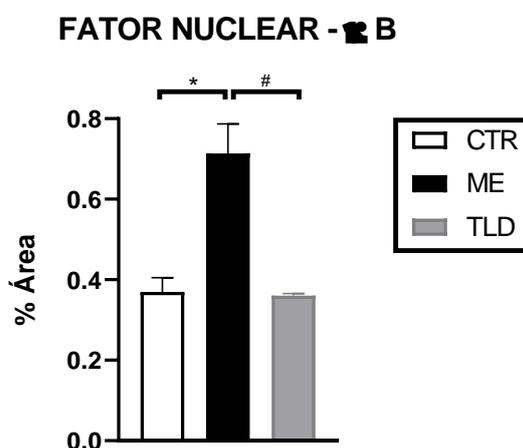


Atividade da mieloperoxidase em homogenato pulmonar. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. * $p = 0,0166$.

c) Imunohistoquímica

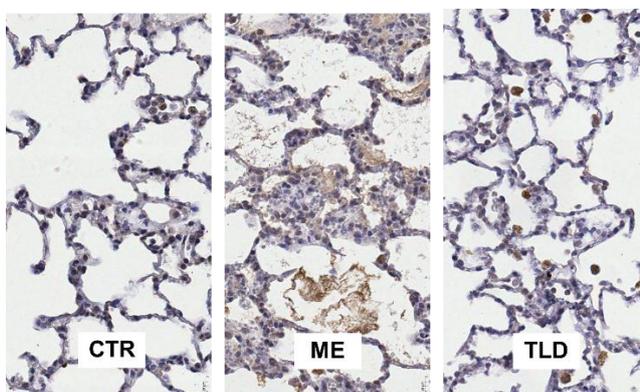
Na análise de imunohistoquímica feita através da marcação do anticorpo NF- κ B (p65) nas lâminas de tecido pulmonar, é possível observar um aumento do marcador NF- κ B nos grupos ME quando comparado ao grupo CTR ($p=0.0006$) e ao grupo TLD ($p=0,0005$). Já entre os grupos CTR x TLD ($p=0.9886$) não foram encontradas diferenças estatísticas significativas (gráfico 09). Esse resultado também foi demonstrado na figura 7, onde é possível visualizar o aumento do marcador do anticorpo NF- κ B (p65) nas imagens das lâminas de parênquima pulmonar (aumento 40x).

Gráfico 9: Avaliação do marcador NF- κ B em lâmina de tecido pulmonar de ratos.



Avaliação do marcador NF- κ B em lâmina de tecido pulmonar. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. * $p = 0,0006$, # $p = 0,0005$.

Figura 7: Imunohistoquímica para NF- κ B em lâmina de tecido pulmonar de ratos.



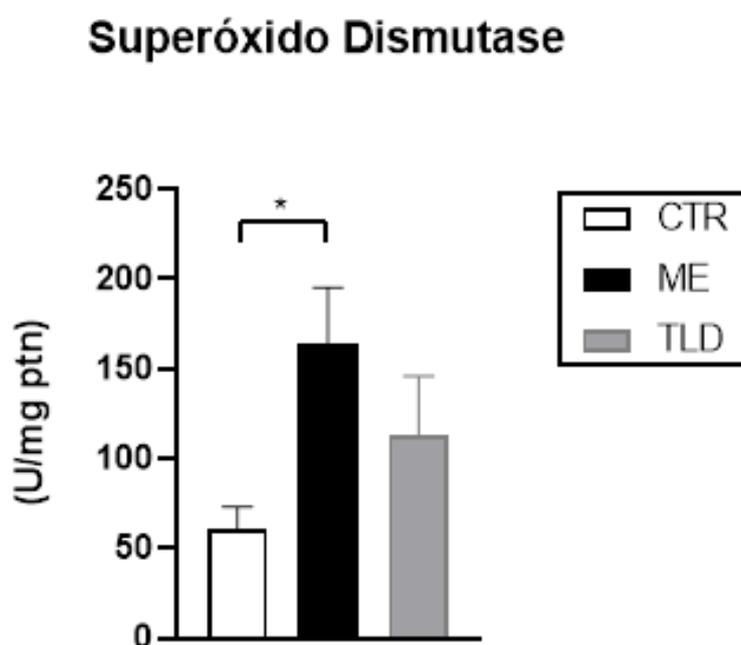
Imunoexpressão do anticorpo Anti-NF- κ B (p65) em lâmina de tecido pulmonar de ratos (aumento 40x).
Fonte: Imagens do laboratório.

d) Marcadores redox e dano oxidativo

A atividade da superóxido dismutase (SOD) no homogenato pulmonar mostrou um aumento significativo no grupo ME quando comparado ao grupo CTR ($p=0,0340$). Não verificamos diferença estatística entre o grupo tratado com TLD quando comparado ao grupo CTR ou ME (CTR $60,71 \pm 12,60$; ME $164,4 \pm 31,03$; TLD $113 \pm 32,89$ U/mg ptn, $p=0,0340$, One-way ANOVA - pós-teste de Tukey) (gráfico 10).

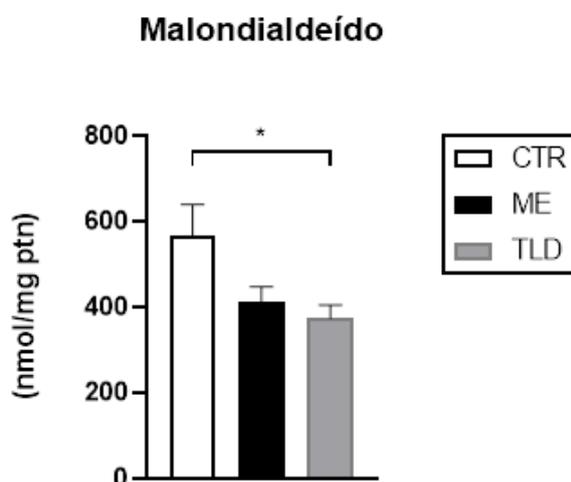
A peroxidação lipídica em nosso modelo foi analisada pelos níveis de malondialdeído (MDA) em homogenato pulmonar, foi possível observar níveis maiores no grupo CTR quando comparado ao grupo TLD ($p=0,0333$). Já na comparação dos grupos submetidos a ME, não foram observadas diferenças significativas (CTR $566,1 \pm 73,42$; ME $412,9 \pm 33,89$; TLD $374,4 \pm 30,51$ nmol/mg ptn, $p=0,0333$, One-way ANOVA - pós-teste de Tukey) (gráfico 11).

Gráfico 10: Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em homogenato pulmonar de ratos.



Atividade de superóxido dismutase em homogenato pulmonar. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significante. * $p=0,0340$.

Gráfico 11: Concentração de Malondialdeído (MDA) em homogenato pulmonar de ratos.



Concentração de malondialdeído em homogenato pulmonar. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. * $p = 0,0333$.

Já nos níveis de catalase (CTR $4,16 \pm 0,65$; ME $3,34 \pm 0,79$; TLD $3,72 \pm 0,19$ U/mg ptn, One-way ANOVA - com pós-teste de Tukey) e espécies reativas de oxigênio (CTR $1691 \pm 265,8$; ME $1507 \pm 105,9$; TLD $1358 \pm 138,7$ μ g formazan/proteína, One-way ANOVA - com pós-teste de Tukey) não foram observadas diferenças significativas, conforme apresentado na tabela 05, $p = 0,6258$ e $p = 0,4523$ respectivamente, entre os grupos, considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Tabela 5: Avaliação da Catalase (CAT) e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em amostra de homogenato pulmonar de ratos.

	CTR	ME	TLD	p
CAT	$4,16 \pm 0,65$	$3,34 \pm 0,79$	$3,72 \pm 0,19$	0,6258
EROs	$1691 \pm 265,8$	$1507 \pm 105,9$	$1358 \pm 138,7$	0,4523

Avaliação de catalase e espécies reativas de oxigênio em amostra de tecido pulmonar. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

e) Análise histológica

Na análise da área de edema perivascular, não foram observadas alterações significativas entre os grupos ($p=0.1464$, One-way ANOVA - pós-teste de Tukey). O mesmo ocorreu na análise do score de lesão pulmonar ($p=0.5078$, One-way ANOVA - pós-teste de Tukey) (tabela 06).

Tabela 6: Avaliação da área de edema perivascular e score de lesão pulmonar em amostra de tecido pulmonar de ratos.

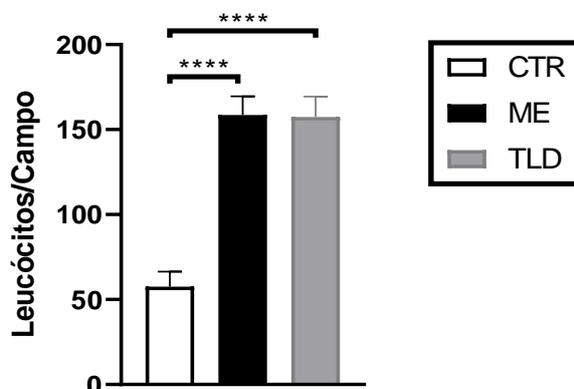
	CTR	ME	TLD	P
ÁREA DE EDEMA PERIVASCULAR	30,25 ± 2,4	26,81 ± 2,4	23,77 ± 1,7	0,1464
SCORE	2 ± 0,00	2,25 ± 0,16	2.25 ± 0,25	0,5078

Análise da área de edema perivascular e do score de lesão pulmonar. Os valores estão expressos com média ± erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p<0,05$ como estatisticamente significativo.

Na contagem total de leucócitos no parênquima pulmonar foi observado um aumento no número de células dos grupos ME e TLD em relação ao CTR. ($p=<0,0001$ em ambos os casos, One-way ANOVA - pós-teste de Tukey) (CTR 57,63 ± 8,81; ME 158,6 ± 11,04; TLD 157,4 ± 12,08 leucócitos/campo, $p=<0,0001$, One-way ANOVA - pós-teste de Tukey) (gráfico 12).

Gráfico 12: Contagem total de leucócitos em lâmina de tecido pulmonar.

Contagem Total de Leucócitos



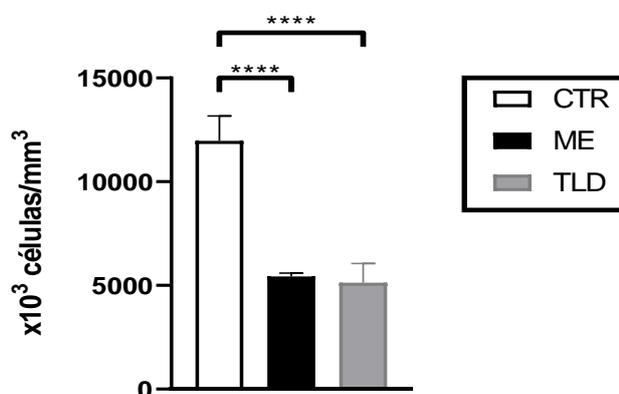
Contagem Total de Leucócitos em lâmina de tecido pulmonar. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

f) Leucograma

Foi possível observar que ao final do experimento houve uma diminuição significativa do número total de leucócitos no sangue periférico, analisados em câmara de Neubauer, tanto para o grupo ME, quanto para o grupo TLD, comparados ao grupo CTR. Entretanto, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos submetidos a ME ($p = 0,9686$) (gráficos 13).

Gráfico 13: Contagem total de leucócitos em lâmina de sangue periférico no momento final do experimento.

Nº de Leucócitos no momento final

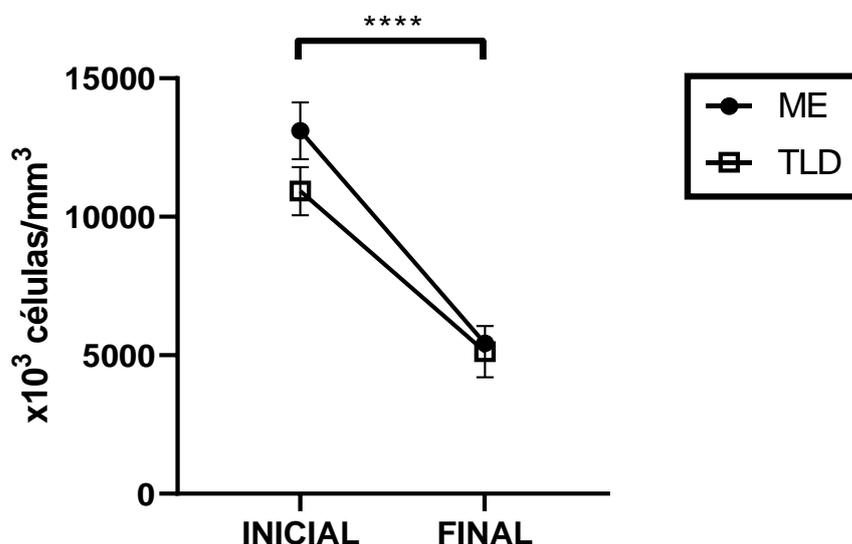


Número total de leucócito no momento final. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Turkey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. **** $p < 0,0001$.

Na análise do leucograma em câmara de Neubauer de sangue periférico ao longo do tempo, nos grupos ME (Inicial: 13.10 ± 1.02 vs. Final: $5.43 \pm 0.16 \times 10^3$ células/mm³, $p < 0.0001$, Two-way ANOVA – pós-teste de Sidak) e TLD (Inicial: 10.92 ± 0.86 vs. Final: $5.13 \pm 0.91 \times 10^3$ células/mm³, $p < 0.0001$, Two-way ANOVA – pós-teste de Sidak), foi observada uma diminuição significativa no momento final, quando comparado ao momento inicial (gráfico 14).

Gráfico 14: Número total de leucócitos avaliados ao longo do tempo, em amostra de sangue periférico.

Nº de Leucócitos ao longo do tempo

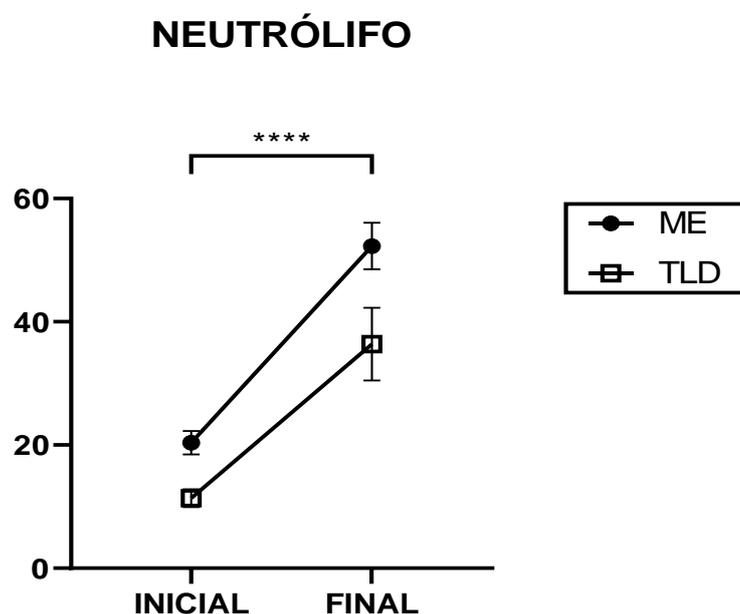


Número total de leucócitos de ratos que foram submetidos a ME, ao longo do tempo. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (Two-way ANOVA) com pós-teste de Sidak considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significante. **** $p < 0,0001$.

g) Contagem de Neutrófilo em amostra de sangue periférico

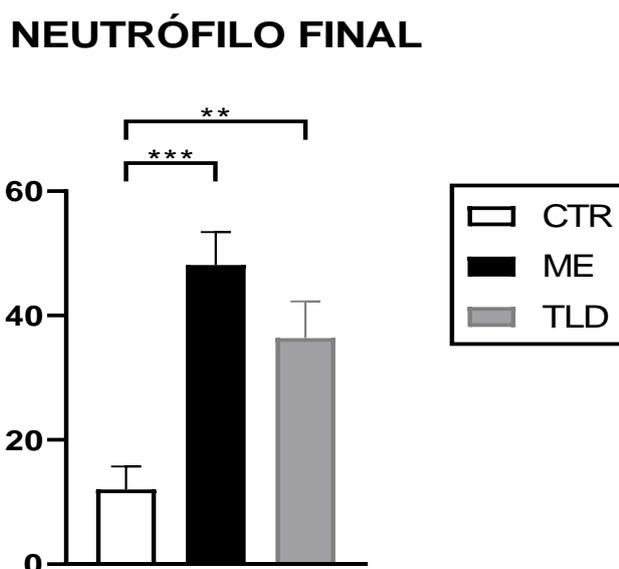
Na análise de neutrófilos, pela técnica de extensão sanguínea, foi possível observar um aumento significativo do momento inicial para o momento final tanto o grupo ME, quanto o grupo TLD ($p < 0,0001$ em ambos os casos) (gráfico 15). O mesmo foi encontrado na análise da comparação de neutrófilo entre o grupo CTR, com os grupos ME e TLD, no momento final foi possível observar um aumento significativo, tanto o grupo ME ($p = 0,0001$), quanto o grupo TLD ($p = 0,0070$) quando comparado ao grupo CRT (gráfico 16).

Gráfico 15: Contagem de neutrófilos inicial e final em amostra de sangue periférico pela técnica de extensão sanguínea.



Análise de neutrófilo em amostra de sangue periférico. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (Two-way ANOVA) com pós-teste de Sidak considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. ****, $p < 0,0001$.

Gráfico 16: Avaliação dos níveis de neutrófilo final em amostra de sangue periférico pela técnica de extensão sanguínea.



Análise de neutrófilo em amostra de sangue periférico. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. **, $p = 0,0070$; ***, $p = 0,0001$.

6 DISCUSSÃO

A falta de doadores de órgãos impacta diretamente na mortalidade de pacientes com doença respiratória terminal que aguardam na fila para realização de transplante pulmonar. Além disso, a demora em realizar a cirurgia agrava a condição do receptor, o que também contribui para aumentar a mortalidade pós-transplante. As taxas de aproveitamento de pulmões doados convertidos em transplante são muito baixas, e estudos visando o tratamento do doador são importantes, tanto para a melhora na qualidade do órgão, quanto para o melhor desempenho do enxerto pós-transplante. O presente trabalho avalia uma abordagem terapêutica baseada no emprego da Talidomida em modelo experimental de doador de órgão submetido a ME (79).

Ao verificar os dados da PAM, é possível observar que não há diferença estatística significativa entre os grupos no momento basal, esse resultado já era esperado, uma vez que a randomização contribui para a homogeneidade da amostra de resultados basais. Em nosso estudo, observamos nos primeiros 60 min após a indução da ME, um quadro de hipotensão, no entanto, com 150 min, os níveis pressóricos retornam à normalidade. Esses resultados são encontrados também em diversos artigos que descrevem o quadro de hipotensão arterial durante a ME, que ocorre devido à descarga autonômica seguida de um processo de vasodilatação intenso. Estudos demonstram que após 1h de ME, os níveis pressóricos são comparáveis aos de animais SHAM (controle) (80-83).

Ruiz (2021) avaliou a progressão dos parâmetros ventilatórios de animais submetidos à ME, verificando aumento da resistência de vias aéreas, resistência pulmonar tecidual e elastância tecidual. A metodologia utilizada foi similar à empregada no presente trabalho. Nosso trabalho não analisou a progressão da MV ao longo do tempo, porém, na comparação entre os grupos ME e TLD ao final do experimento, verificamos que a droga não alterou essas variáveis. Com relação às análises gasométricas, os achados foram similares aos encontrados do estudo de Menegat et al (2017), onde eles demonstraram que não houve alteração nos valores de gasometria arterial, eletrólitos, lactato e hematócrito entre os grupos ME e SHAM (controle) no início do estudo, 3h e 6h após os procedimentos cirúrgicos (81,83).

O edema pulmonar é frequentemente relatado na literatura como uma consequência da ME devido ao aumento da pressão intracraniana, sendo caracterizado como neurogênico. Barklin et al (2009) mostraram que a ME induziu o

aumento da razão peso úmido/seco dos lobos apical e basal estudados em um modelo suíno. Em nosso estudo, nós também observamos um aumento da razão peso úmido/seco, contudo, a administração da Talidomida não foi capaz de diminuir o edema pulmonar. Esses achados são diferentes dos encontrados por Dong et al (2017), que demonstraram que o fármaco foi capaz de reduzir significativamente o edema pulmonar. No entanto, estes pesquisadores utilizaram um modelo de lesão induzida pela bleomicina em pulmões de ratos (47, 84).

Resultados experimentais evidenciaram um aumento significativo dos mediadores infamatórios IL-1 β , IL-6, TNF- α em até 360 min após a indução da ME (6,85). Em contrapartida, modelos de indução de ME com 30 até 240 min de experimento verificaram que os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 não apresentaram alterações estatísticas significativas (86,87). Desta forma, escolhemos trabalhar com o modelo de indução de ME com monitoramento de 6 horas.

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram efeitos benéficos da Talidomida em amostras de tecido hepático, através da redução dos níveis séricos de enzimas hepáticas, TNF- α , IL-1 β e IL-6, macrófagos, MHC de classe I e II e ativação do NF- κ B, e em tecido renal, através da redução de TNF- α e IL-6. Inibindo significativamente a resposta imunológica e imunogenicidade do enxerto (71, 72).

Em nosso estudo, a quantificação do marcador inflamatório IL-10 não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos estudados. Já o marcador IL-6, apresentou um aumento significativo dos grupos ME e TLD comparado ao grupo CTR, no entanto, o grupo tratado com Talidomida teve uma tendência de queda, mas não foi capaz de reduzir esse marcador. Na análise do TNF- α , foi possível observar um aumento significativo do grupo ME comparado ao grupo CTR e grupo TLD, indicando que houve um processo inflamatório gerado pela indução da ME e que nesse marcador, a medicação foi capaz de reduzir essa inflamação, aproximando-se dos mesmos níveis do grupo CTR. Nós também observamos que os níveis de IL-1 β foram maiores nos grupos ME e TLD quando comparados ao grupo CTR, além disso, a quantificação desse marcador também foi maior no grupo ME quando comparado ao grupo TLD, reforçando o processo inflamatório gerado pela ME e a ação eficaz da Talidomida sobre esse marcador. Esses resultados estão de acordo com achados na literatura e estudos prévios do nosso grupo em amostra de tecido hepático e renal (67,71,72).

Na análise de imunohistoquímica para o marcador NF- κ B, foi possível observar que a ME aumentou a ativação desse marcador devido ao processo inflamatório gerado e a Talidomida reduziu significativamente sua ativação, tornando-se igual aos níveis encontrados no controle. Essa descoberta está de acordo com trabalhos publicados e também foi demonstrada em um estudo do nosso grupo, que comprovou os efeitos anti-inflamatórios da talidomida sobre o tecido hepático através da redução significativa no número de macrófagos M1 (71).

Considerando o mecanismo de ação da droga, esperávamos o aumento da expressão de IL-10 e diminuição significativa de IL-6 no grupo TLD. Acreditamos que a dose/tempo de exposição do fármaco pode não ter sido suficiente. Nesse sentido, outros estudos são necessários para avaliação da eficácia da droga neste contexto.

Em relação às alterações pulmonares, Liu et al (2017) descreveram em modelo experimental o efeito protetor da Talidomida sob lesões causadas por intoxicação. Todavia, o efeito do remédio se mostrou diretamente relacionado à dose aplicada, foram testadas as dosagens de 50, 100 e 200 mg/kg. A Talidomida pode reduzir significativamente os níveis de MDA, TNF- α , IL-6 e fosforilação de I κ B- α e p65, além de aumentar a atividade da SOD (67). Nosso estudo apresentou resultados semelhantes, uma vez que os níveis de MDA foram significativamente menores no grupo TLD quando comparado ao grupo CTR, no entanto a atividade de SOD não foi alterada pela medicação. Os resultados da atuação da Talidomida também foram demonstrados por Dong et al (2017), nos quais o medicamento foi capaz de diminuir notavelmente os níveis de MDA e ROS e aumentar os níveis de SOD, esses resultados sugeriram que o fármaco poderia suprimir significativamente a inflamação e o estresse oxidativo (84).

Em nosso estudo, na avaliação da MPO, o grupo que recebeu Talidomida teve níveis aumentados quando comparado ao grupo CTR. Amirshahrokhi (2017) mostrou a redução da atividade da MPO em animais tratados com o remédio, porém o modelo estudado era de inflamação induzida por paraquat (herbicida) e a administração da medicação foi realizada ao longo de seis dias via intraperitoneal (50mg/kg/i.p) (88). Nosso modelo, pela urgência clínica a que estão submetidos os doadores de órgãos, não dispõe de tempo prolongado para a execução do tratamento, desta maneira, foi imprescindível trabalharmos com um protocolo de tratamento agudo.

Na análise de edema perivascular pulmonar não foram observadas alterações significativas entre os grupos estudados, o mesmo aconteceu na análise de score de

lesão pulmonar. Em contrapartida, Zheng (2021) mostrou efeitos protetores de Talidomida (60mg/kg, v.o) em um modelo de lesão pulmonar induzida por paraquat em ratos e células. Nesse estudo, o fármaco reduziu o edema induzido por paraquat em tecidos pulmonares de ratos, e apresentou uma redução do score inflamatório em amostra de tecido pulmonar. Vale destacar que o tratamento adotado pelo estudo foi uma concentração maior que a usada em nossa pesquisa e seu uso foi crônico (6 dias) (89).

Já na contagem total de leucócitos no tecido pulmonar, foi observado um aumento do número de leucócitos nos grupos ME e TLD quando comparados ao grupo CTR. Esse aumento, provavelmente, está relacionado ao recrutamento de células inflamatórias para o tecido em virtude do processo de ME. Outro achado do nosso estudo, que reforça nossa investigação, é a diminuição da contagem total de leucócitos em amostra de sangue periférico dos grupos submetidos a ME quando comparados ao grupo CTR.

Na comparação do leucograma inicial e final, em amostras de sangue periférico, foi possível observar uma diminuição significativa de leucócitos em ambos os grupos submetidos ao processo de ME, sugerindo esta foi capaz de promover um processo de leucopenia, o mesmo foi descrito por Ruiz (2021) (81). Simas et al (2012b) demonstraram os efeitos da ME e trauma na microcirculação mesentérica de ratos, nesse estudo eles observaram que o número de leucócitos rolantes em ratos submetidos à ME foi significativamente reduzido ao longo do tempo (50% em 30 min e 73% em 180 min), esses resultados estão de acordo com os nossos achados (86).

O nível de neutrófilos aumentou significativamente ao longo do tempo em ambos os grupos submetidos a ME. Quando comparados ao grupo CTR, tanto o grupo ME quanto o grupo TLD apresentaram um aumento no número de neutrófilos ao final do estudo, indicando o desenvolvimento de neutrofilia decorrente da inflamação causada pelo processo de ME. Esse resultado está em acordo com o aumento de mieloperoxidase (MPO) observado nestes grupos, uma vez que a enzima MPO é armazenada nos grânulos de neutrófilos e ambos têm grande influência de atuação em processos inflamatórios agudos (90). No entanto, nossos achados mostraram que apesar do fármaco não se igualar aos mesmos níveis do grupo CTR, teve uma tendência a queda, reforçando que a dose/tempo de exposição da Talidomida pode não ter sido suficiente para esse marcador.

Nosso estudo se insere em um cenário em que potenciais doadores de órgãos são recusados devido às lesões causadas pela ME. Pesquisas com o objetivo de tratar o doador, a fim de promover uma manutenção adequada dos órgãos, podem contribuir para o aumento no número de órgãos destinados ao transplante e, conseqüentemente, para a redução da lista de espera e da mortalidade. Todos os marcadores inflamatórios avaliados no estudo foram escolhidos por serem os principais envolvidos no processo de transplante/rejeição do enxerto. Não há na literatura pesquisas envolvendo a ação da Talidomida nos pulmões de animais submetidos a ME e sua correlação com processo inflamatório.

O tratamento injetável com a Talidomida via intraperitoneal apresentou importantes resultados quando avaliamos a redução da inflamação pulmonar de doadores em ME pelos marcadores TNF- α , IL-1 β , NF- κ B, no entanto, mesmo que a medicação não tenha sido eficiente para os marcadores IL-6 e IL-10, esses resultados podem estar associados ao tempo/dose de ação do medicamento e ao tratamento agudo, existem na literatura desfechos promissores da ação anti-inflamatória do fármaco. Diante disso, novos estudos são fundamentais para a compreensão da ação da Talidomida e em um protocolo de ME, para o alcance de respostas seguras e eficazes no tratamento do doador em ME.

Como limitações deste estudo, destacamos a dificuldade de finalização das análises que estavam em andamento durante o período da pandemia, fato esse que comprometeu a primeira versão do trabalho, a via de administração da Talidomida, uma vez que existem restrições do uso injetável deste tipo de medicamento no Brasil em virtude das dificuldades de importação, que necessitam de liberação pela Anvisa e manuseio adequado do fármaco, e a demora na entrega dos kits para ELISA.

A não comercialização convencional da Talidomida injetável comprometeu o tempo de execução do estudo na medida em que sua obtenção no Brasil é burocrática e depende recursos financeiros e tempo.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Com esse estudo, podemos demonstrar que a morte encefálica é responsável por promover alterações que levam a um processo inflamatório agudo significativo, edema pulmonar e leucopenia sistêmica.

Ao analisar a ação da Talidomida sobre a inflamação e edema gerados no tecido pulmonar, ela foi responsável por diminuir os níveis de TNF- α , IL-1 β e NF- κ B que são precursores do processo inflamatório. Além disso, apresentou uma tendência à redução de IL-6 e neutrófilos circulantes.

Não foram encontradas alterações significativas nos dados gasométricos, metabólicos e de mecânica pulmonar.

ANEXOS

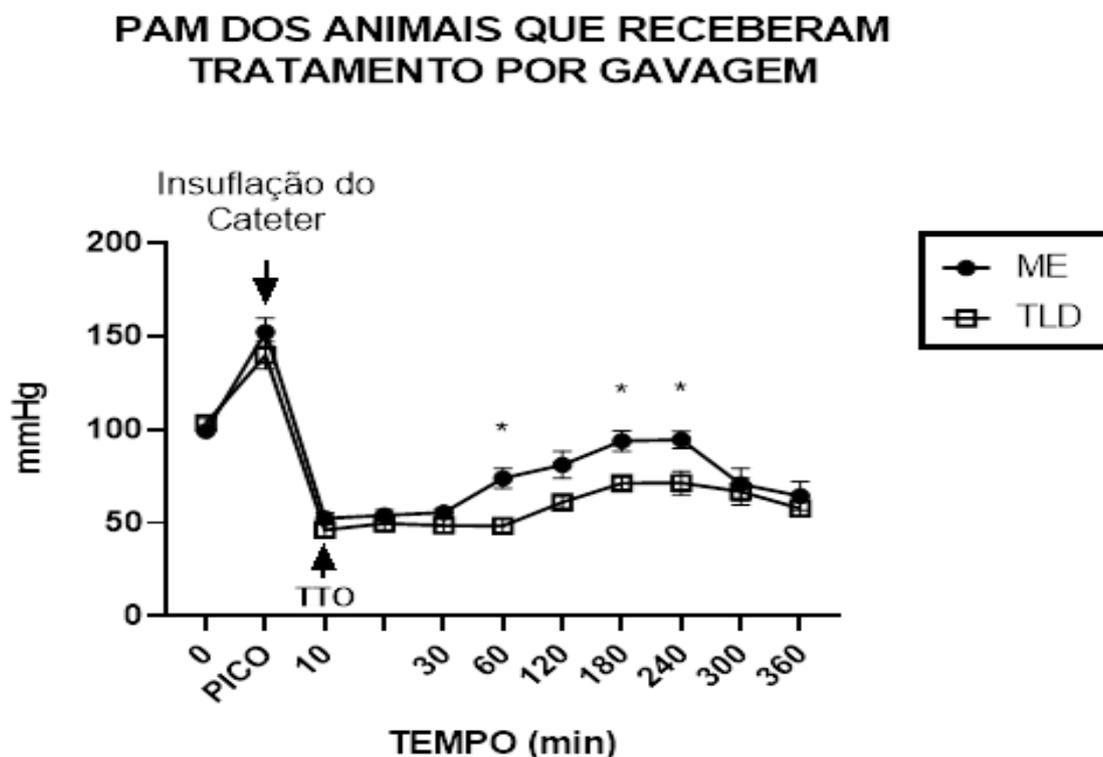
RESULTADOS APRESENTADOS NO EXAME DE QUALIFICAÇÃO

Animais submetidos ao tratamento por gavagem

Esse projeto teve início através de uma parceria entre o Laboratório de Investigação Médica – LIM61 e a disciplina de Neurologia, onde foram estudados os seguintes órgãos: pulmão, fígado e rim de animais (ratos Lewis), submetidos à ME e tratados com 200mg de Talidomida via gavagem.

Na análise da PAM, foi possível observar diferença estatística entre os grupos submetidos a ME nos momentos 1h ($p=0,0059$), 3h ($p=0,0222$) e 4h ($p=0,0171$) (gráfico 17).

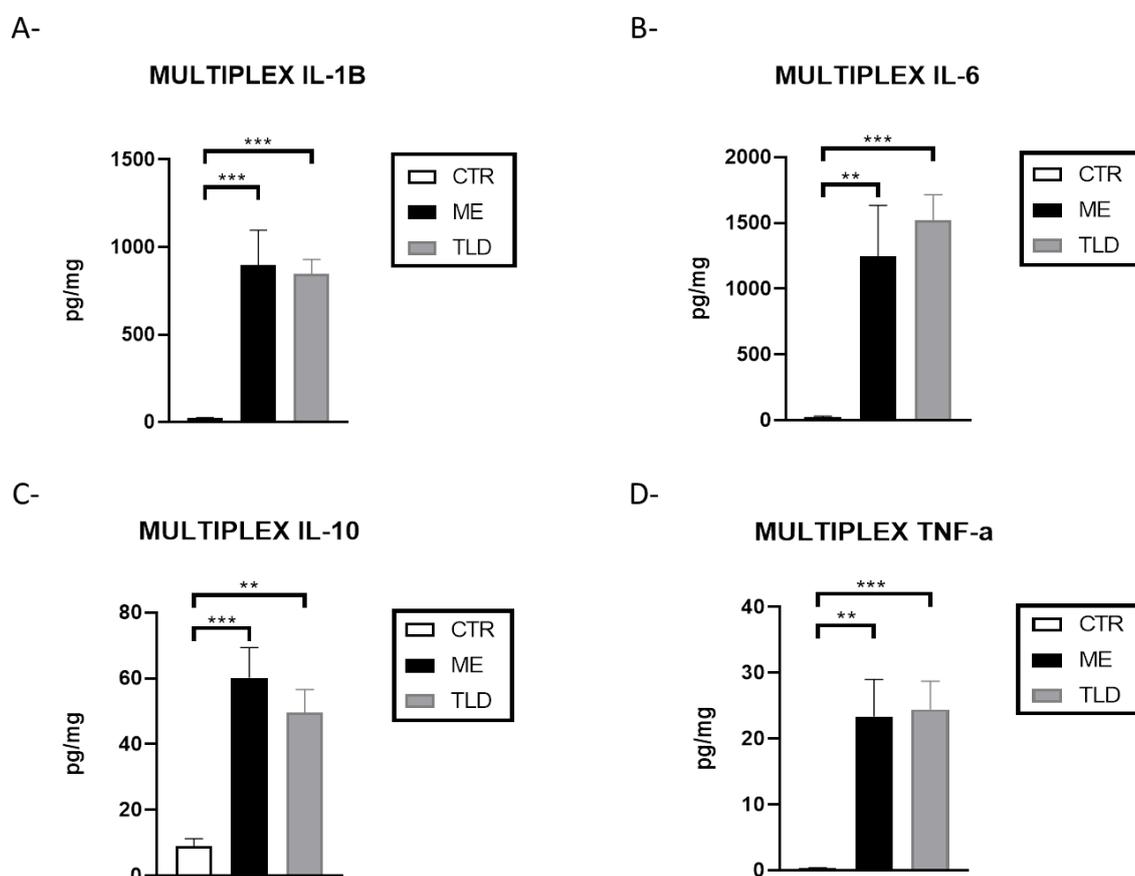
Gráfico 17: Avaliação da pressão arterial média ao longo do experimento dos grupos submetidos à ME e tratados via gavagem.



Monitoramento da PAM nos grupos TLD e ME durante os 360' de experimento. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média, considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. TTO, tratamento.

Os resultados obtidos nas análises de Multiplex em amostra de tecido pulmonar indicaram que todas as interleucinas estudadas apresentaram um aumento significativo entre os grupos submetidos à ME quando comparados a grupo CTR, o mesmo aconteceu para TNF- α (gráfico 18). Na interleucina IL-1 β - ME x CTR $p=0,0002$ e TLD x CTR $p=0,0003$. Na interleucina IL-6 - ME x CTR $p=0,0074$ e TLD x CTR $p=0,0010$. Na IL-10 - ME x CTR $p=0,0002$ e TLD x CTR $p=0,0012$. No TNF- α - ME x CTR $p=0,0027$ e TLD x CTR $p=0,0009$.

Gráfico 18: Análise de Multiplex em amostra de tecido pulmonar para marcadores inflamatórios.

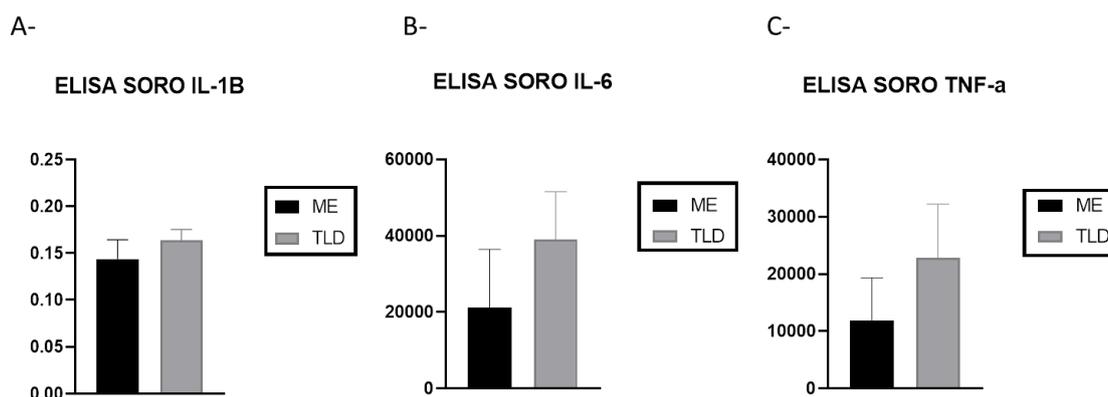


Análise de Multiplex para IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α . Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Na análise de ELISA para as interleucinas IL-1 β (ME $0,14 \pm 0,02$; TLD $0,16 \pm 0,01$ pg/mL, One-way ANOVA - com pós-teste de Tukey) e IL-6 (ME 21.109 ± 15.340 ; TLD 38.924 ± 12.587 pg/mL, One-way ANOVA - com pós-teste de Tukey), e para o marcador TNF- α (ME 11.903 ± 7.451 ; TLD 22.852 ± 9.349 pg/mL, One-way ANOVA -

com pós-teste de Tukey) em amostra de soro, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos ($p=0.4014$; $p=0.3928$; $p=0.3859$, respectivamente) (gráfico 19).

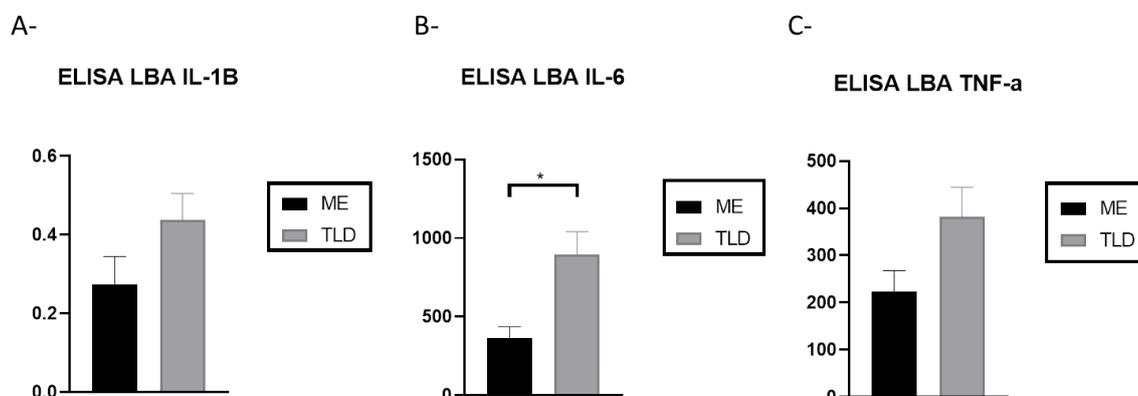
Gráfico 19: Análise de ELISA em amostra de soro para marcadores inflamatórios.



Análise de ELISA para IL-1 β , IL-6 e TNF- α em amostra de soro. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (teste t de Student) considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Na análise de ELISA para a interleucina IL-1 β (ME $0,27 \pm 0,07$; TLD $0,43 \pm 0,06$ pg/mL, teste t de Student) e para o marcador TNF- α (ME $223,6 \pm 44,23$; TLD $381,6 \pm 62,96$ pg/mL, teste t de Student) em amostra de LBA, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos ($p=0,1170$ e $p=0,0800$, respectivamente), já na interleucina IL-6, quando comparados os dois grupos submetidos à ME, o grupo TLD apresentou um aumento significativo ($p=0,0092$) (gráfico 20).

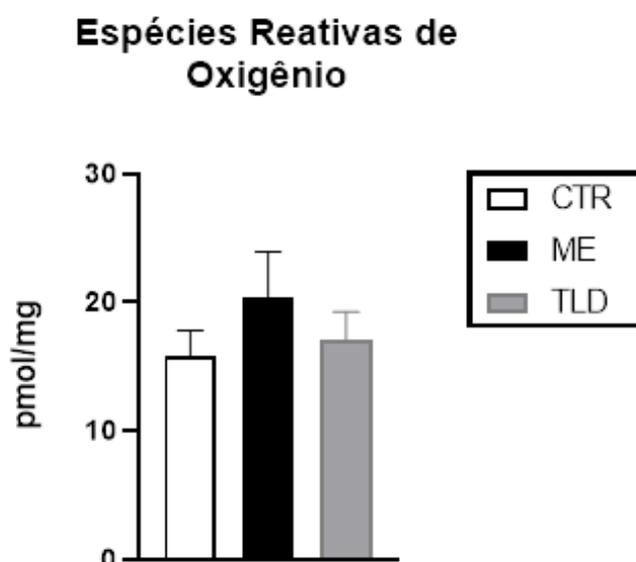
Gráfico 20: Análise de ELISA em amostra de LBA para marcadores inflamatórios.



Análise de ELISA para IL-1 β , IL-6 e TNF- α em amostra de LBA. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (teste t de Student) considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Na análise de Espécies Reativas de Oxigênio, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos ($p = 0,5034$) (CTR $15,73 \pm 2,06$; ME $20,34 \pm 3,58$; TLD $17,06 \pm 2,19$ pg/mL, teste t de Student) (gráfico 21).

Gráfico 21: Análise de Espécies Reativas de Oxigênio em amostra de tecido pulmonar para marcadores inflamatórios.



Análise de ROS. Os valores estão expressos com média \pm erro padrão da média e os grupos foram testados através da análise de variância (One-way ANOVA) com pós-teste de Tukey considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reis FP, Pêgo-Fernandes PM. The 500th Lung Transplantation at the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: Reflecting on Our Journey and Looking Ahead. *São Paulo Med J.* 2023;141(4).
2. de Perrot M, Snell GI, Babcock WD, Meyers BF, Patterson G, Hodges TN, Keshavjee S. Strategies to optimize the use of currently available lung donors. *J Heart Lung Transplant.* 2004 Oct;23(10):1127-34.
3. D'Império F. Morte encefálica, cuidados ao doador de órgãos e transplante de pulmão. *Rev bras ter intensiva.* 2007Jan;19(1):74–84.
4. Avlonitis VS, Fisher AJ, Kirby JA, Dark JH. Pulmonary transplantation: the role of brain death in donor lung injury. *Transplantation.* 2003 Jun 27;75(12):1928-33.
5. Floerchinger B, Oberhuber R, Tullius SG. Effects of brain death on organ quality and transplant outcome. *Transplant Rev (Orlando).* 2012 Apr;26(2):54-9.
6. Skrabal CA, Thompson LO, Potapov EV, Southard RE, Joyce DL, Youker KA, et al. Organ-specific regulation of pro-inflammatory molecules in heart, lung, and kidney following brain death. *J Surg Res.* 2005 Jan;123(1):118-25.
7. Morrison MI, Pither TL, Fisher AJ. Pathophysiology and classification of primary graft dysfunction after lung transplantation. *J Thorac Dis.* 2017 Oct;9(10):4084-4097.
8. Camargo PC, Teixeira RH, Carraro RM, Campos SV, Afonso Junior JE, Costa AN, et al. Lung transplantation: overall approach regarding its major aspects. *J bras pneumol.* 2015Nov;41(6):547–53.
9. Andrade AF de, Paiva WS, Amorim RLO de, Figueiredo EG, Rusafa Neto E, Teixeira MJ. Mecanismos de lesão cerebral no traumatismo cranioencefálico. *Rev Assoc Med Bras.* 2009;55(1):75–81.
10. Zhang W, Potrovita I, Tarabin V, Herrmann O, Beer V, Weih F, et al. Neuronal activation of NF-kappaB contributes to cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Jan;25(1):30-40.
11. Harari OA, Liao JK. NF-κB and innate immunity in ischemic stroke. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Oct;1207:32-40.
12. Yagyu T, Kobayashi H, Matsuzaki H, Wakahara K, Kondo T, Kurita N, et al. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 expression in endometriotic stromal cells, possibly through suppression of nuclear factor-kappaB activation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 May;90(5):3017-21.
13. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med.* 1991 Mar 1;173(3):699-703.

14. Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Baldwin AS Jr. Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. *J Biol Chem.* 2001 Jun 22;276(25):22382-7.
15. Mendes KD, Roza B de A, Barbosa S de FF, Schirmer J, Galvão CM. Transplante de órgãos e tecidos: responsabilidades do enfermeiro. *Texto contexto - enferm.* 2012Oct;21(4):945-53.
16. Roza BA, Odierna MT, Glezer M, Sá JR. Captação de órgãos para transplantes [Internet]. In: Knobel E. *Conduitas no paciente grave.* São Paulo: Editora Atheneu; 2006. p. 1753-1764.
17. ALEXIS CARREL. The surgery of blood vessels. *Johns Hopkings Hospital Bull,* v. 18, p. 18- 28, 1907
18. Venuta F, Van Raemdonck D. History of lung transplantation. *J Thorac Dis.* 2017 Dec;9(12):5458-5471.
19. Silva PR. Transplante cardíaco e cardiopulmonar: 100 anos de história e 40 de existência. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2008Jan;23(1):145-52.
20. Linden PK. History of solid organ transplantation and organ donation. *Crit Care Clin.* 2009 Jan;25(1):165-84, ix.
21. Murray JE, Tilney NL, Wilson RE. Renal transplantation: a twenty-five year experience. *Ann Surg.* 1976 Nov;184(5):565-73.
22. Braga KA. Estudo dos efeitos da prednisona sobre o sistema mucociliar de ratos [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 116 p.
23. Correia AT. Efeitos do basiliximab com e sem a terapia tríplice na depuração mucociliar das vias aéreas de ratos: estudo experimental [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017. 137 p.
24. Banner NR, Yacoub MH. Cyclosporine in thoracic organ transplantation. *Transplant Proc.* 2004 Mar;36(2 Suppl):302S-308S.
25. Calne R. Cyclosporine as a milestone in immunosuppression. *Transplant Proc.* 2004 Mar;36(2 Suppl):13S-15S.
26. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML Jr, Walker GR Jr. Lung homotransplantation in man. *JAMA.* 1963 Dec 21;186:1065-74.
27. Reitz BA. The first successful combined heart-lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Apr;141(4):867-9.
28. Toronto Lung Transplant Group. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 1986 May 1;314(18):1140-5.

29. Jatene FB, Pêgo-Fernandes PM, Medeiros IL de. Transplante pulmonar. Rev. Med. (São Paulo). 6 de setembro de 2009;88(3):111-22.
30. Cooper JD. The evolution of techniques and indications for lung transplantation. Ann Surg. 1990 Sep;212(3):249-55; discussion 255-6.
31. Rodrigues EM Filho, Franke CA, Junges JR. Transplante de pulmão e alocação de órgãos no Brasil: necessidade ou utilidade. Rev. Saúde Pública. (São Paulo). 20 de fevereiro de 2019;53(23).
32. Secretaria de Estado da Saúde (BR) - Central de Transplantes. Manual do Paciente. Transplante de pulmão [Internet]. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo. 5 p. Available from: https://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/cidadao/sistemas-e-formularios/manuais-do-paciente/manual_de_transplante_de_pulmao.pdf.
33. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos [Internet]. Available from: <<http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?c=927>>.
34. Costa da Silva F Jr, Afonso JE Jr, Pêgo-Fernandes PM, Caramori ML, Jatene FB. São Paulo lung transplantation waiting list: patient characteristics and predictors of death. Transplant Proc. 2009 Apr;41(3):927-31.
35. Marinho A, Cardoso SS, Almeida VV. Geographic disparities in organ transplantation in Brazil. Cad Saúde Pública. 2010Apr;26(4):786–96.
36. Cypel M, Keshavjee S. Expansion of the donor lung pool: use of lungs from smokers. Lancet. 2012 Aug 25;380(9843):709-11.
37. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th adult lung and heart-lung transplant report-2012. J Heart Lung Transplant. 2012 Oct;31(10):1073-86.
38. Snell GI, Westall GP. Selection and management of the lung donor. Clin Chest Med. 2011 Jun;32(2):223-32.
39. Chambers DC, Yusen RD, Cherikh WS, Goldfarb S, Kucheryavaya AY, Khusch K, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Lung And Heart-Lung Transplantation Report—2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. J Heart Lung Transplant. 2017 Oct;36(10):1047-1059.
40. Yusen RD, Edwards LB, Dipchand AI, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report-2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant. J Heart Lung Transplant. 2016 Oct;35(10):1170-1184.
41. Fiorelli AI, Stolf NA, Pêgo-Fernandes PM, Oliveira Junior JL, Santos RH,

Contreras CA, et al. Recommendations for use of marginal donors in heart transplantation: Brazilian Association of Organs Transplantation guideline. *Transplant Proc.* 2011 Jan-Feb;43(1):211-5.

42. Treckmann J, Moers C, Smits JM, Gallinat A, Maathuis MH, van Kasterop-Kutz M, et al. Machine perfusion versus cold storage for preservation of kidneys from expanded criteria donors after brain death. *Transpl Int.* 2011 Jun;24(6):548-54.

43. Cypel M, Levvey B, Van Raemdonck D, Erasmus M, Dark J, Love R, et al. International Society for Heart and Lung Transplantation Donation After Circulatory Death Registry Report. *J Heart Lung Transplant.* 2015 Oct;34(10):1278-82.

44. Pêgo-Fernandes PM, Samano MN, Fiorelli AI, Fernandes LM, Camargo SM, Xavier AM, et al. Recommendations for the use of extended criteria donors in lung transplantation. *Transplant Proc.* 2011 Jan-Feb;43(1):216-9.

45. Doyle MB, Collins K, Vachharajani N, Lowell JA, Shenoy S, Nalbantoglu I, et al. Outcomes Using Grafts from Donors after Cardiac Death. *J Am Coll Surg.* 2015 Jul;221(1):142-52.

46. Yeung JC, Cypel M, Waddell TK, van Raemdonck D, Keshavjee S. Update on donor assessment, resuscitation, and acceptance criteria, including novel techniques-non-heart-beating donor lung retrieval and ex vivo donor lung perfusion. *Thorac Surg Clin.* 2009 May;19(2):261-74.

47. Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009 Apr;53(4):425-35.

48. Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JA, Leuvenink HG, van der Heide JJ, van Goor H, et al. Effects of brain death on stress and inflammatory response in the human donor kidney. *Transplant Proc.* 2005 Jan-Feb;37(1):367-9.

49. Dinallo S, Waseem M. Cushing Reflex. 2023 Mar 20. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-.

50. Blanco ML, Condino Neto A. O fator nuclear Kappa B: uma nova perspectiva para o estudo de drogas antiinflamatórias. *Rev. Ciênc. Méd.* 28º de novembro de 2012;12(4).

51. Saat TC, Susa D, Roest HP, Kok NF, van den Engel S, Ijzermans JN, et al. A comparison of inflammatory, cytoprotective and injury gene expression profiles in kidneys from brain death and cardiac death donors. *Transplantation.* 2014 Jul 15;98(1):15-21.

52. Stiegler P, Sereinigg M, Puntschart A, Bradatsch A, Seifert-Held T, Wiederstein-Grasser I, et al. Oxidative stress and apoptosis in a pig model of brain death (BD) and living donation (LD). *J Transl Med.* 2013 Oct 2;11:244.

53. Koudstaal LG, 't Hart NA, Ottens PJ, van den Berg A, Ploeg RJ, van Goor H, et al. Brain death induces inflammation in the donor intestine. *Transplantation.* 2008 Jul

15;86(1):148-54.

54. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986 Aug 29;46(5):705-16.

55. Franco DG. Fator de transcrição nuclear Kappa B no sistema nervoso central: do Fisiológico ao Patológico. *Rev. Biol.* 15 de abril de 2010;4(1):35-9.

56. Gareus R, Kotsaki E, Xanthoulea S, van der Made I, Gijbels MJ, Kardakaris R, et al. Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. *Cell Metab.* 2008 Nov;8(5):372-83.

57. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Nov;20(11):E83-8.

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

59. Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci.* 2006 Apr 5;26(14):3813-20.

60. Tabary O, Boncoeur E, de Martin R, Pepperkok R, Clément A, Schultz C, et al. Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Signal.* 2006 May;18(5):652-60.

61. Castier Y, Ramkhelawon B, Riou S, Tedgui A, Lehoux S. Role of NF-kappaB in flow-induced vascular remodeling. *Antioxid Redox Signal.* 2009 Jul;11(7):1641-9.

62. de Sá Lima L, Kawamoto EM, Munhoz CD, Kinoshita PF, Orellana AM, Curi R, et al. Ouabain activates NFkB through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. *Neuropharmacology.* 2013 Oct;73:327-36.

63. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nat Immunol.* 2011 Jul 19;12(8):695-708.

64. Jin X, Lu S, Xing X, Wang L, Mu D, He M, et al. Thalidomide: features and potential significance in oral precancerous conditions and oral cancer. *J Oral Pathol Med.* 2013 May;42(5):355-62.

65. Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida. Talidomida ou "Amida Nftálica do Ácido Glutâmico" [Internet]. 2007. Available from: <http://www.talidomida.org.br/oque.asp>.

66. Park SJ, Kim HS, Yang HM, Park KW, Youn SW, Jeon SI, et al. Thalidomide as a potent inhibitor of neointimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 May;24(5):885-91.

67. Liu T, Xie Y, Xu M, Zheng F. [Protective effect of thalidomide on ALI induced by paraquat poisoning in rats and its mechanism]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2017 Nov;29(11):977-981. Chinese.
68. Arai H, Furusu A, Nishino T, Obata Y, Nakazawa Y, Nakazawa M, et al. Thalidomide prevents the progression of peritoneal fibrosis in mice. *Acta Histochem Cytochem*. 2011 Apr 28;44(2):51-60.
69. Majumdar S, Lamothe B, Aggarwal BB. Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H₂O₂, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. *J Immunol*. 2002 Mar 15;168(6):2644-51.
70. Santana AC, Marinotto DB, Dellê H, Cordeiro AC, Noronha IL. Effectiveness of thalidomide and tamoxifen in preventing neointimal hyperplasia in experimental vascular injury in rats. *Transplant Proc*. 2010 Mar;42(2):585-8.
71. Santana AC, Andraus W, Silva FM, Dellê H, Pepineli R, de Moraes EL, et al. Immunomodulatory effects of thalidomide in an experimental brain death liver donor model. *Sci Rep*. 2021 Sep 28;11(1):19221.
72. Santana AC, Andraus W, Silva FMO, Sala ACG, Schust AS, Neri LHM, et al. Thalidomide modulates renal inflammation induced by brain death experimental model. *Transpl Immunol*. 2022 Dec;75:101710.
73. Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem*. 2006;27(1):31-44.
74. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem*. 1987;22(2):111-80.
75. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
76. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186:421-31.
77. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem*. 1983 Jul 15;132(2):345-52.
78. Krebs J, Pelosi P, Tsagogiorgas C, Zoeller L, Rocco PR, Yard B, et al. Open lung approach associated with high-frequency oscillatory or low tidal volume mechanical ventilation improves respiratory function and minimizes lung injury in healthy and injured rats. *Crit Care*. 2010;14(5):R183.
79. Guetti NR, Marques IR. Nursing assistance to the potential organ donor with brain death. *Rev Bras Enferm*. 2008 Jan-Feb;61(1):91-7.

80. Simas R, Kogiso DH, Correia C de J, Silva LF, Silva IA, Cruz JW, et al. Influence of brain death and associated trauma on solid organ histological characteristics. *Acta Cir Bras*. 2012(a) Jul;27(7):465–70.
81. Ruiz LM. Avaliação funcional e inflamatória de pulmões submetidos ao tratamento com solução salina hipertônica em modelo de morte encefálica [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2021. 101 p.
82. Correia CJ, Armstrong R Jr, Carvalho PO, Simas R, Sanchez DCJ, Breithaupt-Faloppa AC, et al. Hypertonic Saline Solution Reduces Microcirculatory Dysfunction and Inflammation in a Rat Model of Brain Death. *Shock*. 2019 Apr;51(4):495-501.
83. Menegat L, Simas R, Caliman JM, Zanoni FL, Jacysyn JF, Silva LF, et al. Evidence of bone marrow downregulation in brain-dead rats. *Int J Exp Pathol*. 2017 Jun;98(3):158-165.
84. Dong X, Li X, Li M, Chen M, Fan Q, Wei W. Inhibitory effects of thalidomide on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats via regulation of thioredoxin reductase and inflammations. *Am J Transl Res*. 2017 Oct 15;9(10):4390-4401.
85. Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, Mackenzie HS, Shaw GD, Waaga AM, et al. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation*. 1998 Jun 27;65(12):1533-42.
86. Simas R, Sannomiya P, Cruz JWMC, Correia C de J, Zanoni FL, Kase M, et al. Paradoxical effects of brain death and associated trauma on rat mesenteric microcirculation: an intravital microscopic study. *Clinics*. 2012(b);67(1):69–75.
87. Damman J, Nijboer WN, Schuurs TA, Leuvenink HG, Morariu AM, Tullius SG, et al. Local renal complement C3 induction by donor brain death is associated with reduced renal allograft function after transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jul;26(7):2345-54.
88. Amirshahrokhi K. Anti-inflammatory effect of thalidomide in paraquat-induced pulmonary injury in mice. *Int Immunopharmacol*. 2013 Oct;17(2):210-5.
89. Zheng F, Zhu J, Zhang W, Fu Y, Lin Z. Thal protects against paraquat-induced lung injury through a microRNA-141/HDAC6/I κ B α -NF- κ B axis in rat and cell models. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2021 Feb;128(2):334-347.
90. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 2018 Feb 15;640:47-52.